UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1948 N° 56

CONTRIBUTION
à l'étude des "ANTIPÉNICILLINES"
LA PÉNICILLINASE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1948

PAR

Jacques MONNIER

Interne des Hôpitaux

MEMBRES DU JURY

MM. TAPIE, *Président.*
MOREL, ANDRIEU, DARNAUD, *Assesseurs.*
LAPORTE, *Suppléant.*

TOULOUSE
IMPRIMERIE DU CENTRE
CAMILLI & FOURNIÉ
28, ALLÉE JEAN-JAURÈS, 28

1948

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548920_0015

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1948 N° 56

CONTRIBUTION
à l'étude des "ANTIPÉNICILLINES"
LA PÉNICILLINASE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1948

PAR

Jacques MONNIER

Interne des Hôpitaux

MEMBRES DU JURY { MM. TAPIE, *Président.* ; MOREL, ANDRIEU, DARNAUD } *Assesseurs.* ; LAPORTE, *Suppléant.*

TOULOUSE
IMPRIMERIE DU CENTRE
CAMILLI & FOURNIÉ
28, ALLÉE JEAN-JAURÈS, 28

1948

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

	MM.
Doyen	CALVET
Assesseur	LEFFBVRE
Doyens honoraires	BARDIER
	GORSE

Professeurs honoraires

MM. DALOUS, RISPAL, LAFORGUE, ARGAUD, MERIEL, CAUBET, MAURIN, RIBAUT, SERR.

PROFESSEURS

	MM.
Clinique de neurologie et psychiatrie	RISER
Clinique médicale	TAPIE
	ROQUES
Clinique obstétricale	GARIPUY
Physiologie	SOULA
Clinique chirurgicale et du cancer	DUCUING
Physique biologique et médicale	BUGNARD
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	NANTA
Chimie et toxicologie	BRUSTIER
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL
Clinique chirurgicale et gynécologie	LEFEBVRE
Anatomie	VALLOIS
	CLERMONT
Histoire naturelle	DELAS

	MM.
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL (R.).
Pharmacie	CAUJOLLE
Pathologie interne	MOREL
Bactériologie - Hygiène - Médecine sociale	ANDRIEU
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	VIRENQUE
Clinique des maladies des voies urinaires	FABRE (P.).
Matière médicale	VINCENT
Hydrologie thérapeutique et climatologie	MERIEL (P.).
Anatomie pathologique	FABRE (J.).
Clin. otho-rhino-laryngologique et chir. maxillo-faciale	CALVET
Clinique ophtalmologique	CALMETTES
Chimie biologique	VALDIGUIÉ
Médecine lég. et du travail	PLANQUES
Histologie et embryologie	BROUSSY

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Physiologie	M. BAISSET	Obstétrique	GUILHEM.
Anatomie	M. COULOUMA		

AGRÉGÉS

	MM.
Anatomie	LAZORTHES
Histologie	BIMES, ch. de f.
Médecine	GADRAT
	DARNAUD
	GERAUD
	DARDENNE
	LAPORTE (J.)
Odonto-Stomatologie	CADENAT

	MM.
Chirurgie	GRIMOUD
	RIEUNAU
	DIEULAFÉ
	DAMBRIN (P.)
Ophtalmologie	DEODATI
Physique médicale	MARQUES
Pharmacie	COUTURIER
Chimie gén. pharm.	BLANC
Histoire naturelle	Mme DULUCQ-MATHOU

COURS COMPLÉMENTAIRES

	MM.
Cours d'obstétrique aux élèves sages-femmes	GARIPUY
Cours d'anat physiol. et pathologique élémentaire aux élèves sages-femmes	GUILHEM
Chimie biologique	VALDIGUIE
Chimie pathologique	VALDIGUIE
Chimie minérale	BLANC
Physique pharmaceutique	AUVERGNAT
Dermatol. et syphiligraphie	BAZEX
Législation pharmaceutique	BOUISSET
Clinique de la tuberculose	MOREL (L.)
	DAMBRIN (P.)

	MM.
Microbiologie	BOUISSET
Parasitologie	LASSERRE
Botanique et cryptogamie	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique	BLANC
Hydrologie et géologie	ASTRE
Médecine sociale et du trav.	BOUNHOURE
Anatomie médico-chirurgic.	THOMAS
Pharmacodynamie	BOUNHOURE
Bactériologie et hygiène	LAPORTE
Urologie	LHEZ
Ophtalmologie	DEODATI
Neuro-chirurgie	LAZORTHES
Oto-rhino-laryngologie	CLAUX

Secrétaire de la Faculté..... DUCROS

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération du 12 mai 1891)

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MA FEMME

A MES PARENTS

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN TAPIE

PROFESSEUR DE CLINIQUE MÉDICALE

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Vous nous faites le grand honneur de nous compter parmi vos élèves. Veuillez trouver en tête de ce travail l'expression de notre sincère gratitude et de notre respectueux attachement.

A NOTRE MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ANDRIEU

PROFESSEUR DE BACTÉRIOLOGIE, HYGIÈNE

ET MÉDECINE SOCIALE

Nous vous devons le privilège de pouvoir travailler dans votre laboratoire. Vous nous avez prodigué conseils et encouragements durant toute cette étude.

Nous voudrions vous exprimer ici notre profonde reconnaissance.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR LOUIS MOREL

PROFESSEUR DE PATHOLOGIE INTERNE

Notre sincère gratitude pour l'intérêt bienveillant que vous nous avez porté durant le cours de nos études.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ DARNAUD

Nos vifs remerciements pour vos conseils précieux.

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ
JACQUES LAPORTE

Témoignage d'une ancienne et fidèle amitié.

A NOS MAITRES DE LA FACULTÉ ET DES HOPITAUX :

A MONSIEUR LE DOCTEUR JEAN BAUDOT

PHTISIOLOGUE DES HÔPITAUX

Au Médecin-Chef et créateur du « Groupe Sanitaire Toulouse », avec notre profonde reconnaissance pour nous avoir appelé à faire partie de la formation qu'il commandait dans la 1re Armée française et nous avoir permis de vivre sous ses ordres une magnifique période.

A TOUS NOS CAMARADES DU « GROUPE SANITAIRE TOULOUSE »

A MONSIEUR LE DOCTEUR JACQUES AVERSENQ

CHEF DE TRAVAUX DE BACTÉRIOLOGIE

A MADAME LE DOCTEUR ENJALBERT

MÉDECIN-CHEF DU LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL DE BACTÉRIOLOGIE

Dont l'aide amicale nous a été si précieuse. Nos remerciements très sincères.

A MONSIEUR LE DOCTEUR LEVRAT

ASSISTANT DE BACTÉRIOLOGIE

A TOUS NOS AMIS DU LABORATOIRE
DE BACTERIOLOGIE DE LA FACULTE

A TOUS NOS AMIS DE LA CLINIQUE MEDICALE
DU PROFESSEUR TAPIE

A NOS CHEFS DE CONFERENCES D'EXTERNAT
ET D'INTERNAT

A NOS CAMARADES D'INTERNAT

INTRODUCTION

Durant le cours de nos stages comme interne dans le service de Clinique Médicale du Professeur Jean Tapie, nous avons eu maintes fois l'occasion d'entendre notre Maître faire part à ses collaborateurs de sa déception devant le faible secours apporté actuellement par le laboratoire de Bactériologie Clinique au diagnostic de nombreuses affections de médecine générale. Notre Maître oppose volontiers la proportion relativement élevée d'hémocultures et d'ensemencements positifs que l'on obtenait, il y a quelques années, au taux considérable de résultats négatifs enregistrés actuellement : hémocultures et ensemencements restent bien souvent désespérément stériles, malgré des efforts sérieux pour améliorer la technique de prélèvement et de culture sur des milieux aussi riches et électifs que possible.

Il est évidemment tentant de mettre ces échecs pour une bonne part sur le compte des puissantes thérapeutiques anti-infectieuses polyvalentes actuellement utilisées. En effet, chez un malade atteint d'une infection microbienne localisée — pleurésie, méningite, etc... — ou généralisée et soumis à une thérapeutique anti-infectieuse par les dérivés sulfamidés et la pénicilline, les résultats des examens de laboratoire sont souvent, pour le bactériologiste, d'une interprétation délicate et le clinicien se trouve parfois désemparé en face de la contradiction apparente des données de la clinique et des résultats biologiques; les difficultés paraissent provenir, pour une grande part, de la présence dans le

prélèvement de sulfamides ou de pénicilline en quantité suffisante pour inhiber ou gêner la pousse des germes, mais cependant insuffisante pour entraîner une action bactéricide complète.

C'est pourquoi, lorsque nous avons demandé à notre Maître, le Professeur Tapie, un sujet de travail pour notre thèse inaugurale, il nous a proposé celui-ci : *étudier et mettre au point, si possible, une technique pratique de l'hémoculture et de l'ensemencement d'exsudats provenant de malades soumis à la sulfamidothérapie ou à la pénicillinothérapie.*

Un peu déroutés d'emblée par la présentation purement microbiologique de cette question, nous nous y sommes ensuite vivement intéressés, convaincus de son intérêt en pratique clinique. En somme, la préoccupation fondamentale du clinicien demeure : arriver à un diagnostic aussi précis que possible, choisir la thérapeutique adéquate, en contrôler l'efficacité, cliniquement d'abord, biologiquement ensuite, toutes les fois que c'est possible.

Au premier abord nous avons cru, bien à tort, le problème facile à résoudre.

En ce qui concerne les *sulfamides*, une magnifique solution découle de la découverte par Woods, en 1940, du rôle de l'*acide para-amino-benzoïque*. Cet auteur a montré, en effet, que l'action inhibitrice des sulfamides sur la croissance microbienne est complètement renversée par l'adjonction au milieu de culture de petites quantités d'acide para-amino-benzoïque, composé très proche, au point de vue structural, des sulfamides. Ce corps s'est révélé un facteur de croissance pour certains organismes incapables d'en faire la synthèse : d'où son nom de vitamine H'. Woods et Fildes ont alors proposé cette hypothèse qui s'est révélée, par la suite, extrêmement fertile : l'effet bactériostatique des sulfamides est dû à la compétition qu'ils exercent

avec l'acide para-amino-benzoïque, pour entrer dans les réactions vitales où celui-ci intervient. Le sulfamide devient une antivitamine, — la première connue, — et l'acide para-amino-benzoïque un *antisulfamide*. En pratique, il suffira donc d'ajouter une certaine quantité de ce composé au milieu de culture, non pour détruire le corps sulfamidé présent, mais pour inhiber son action bactériostatique.

Pour la *Pénicilline*, la notion très largement répandue de son instabilité en solution pouvait laisser croire que le fait de porter à l'étuve à 37° un liquide organique contenant de la Pénicilline, ensemencé sur un milieu nutritif, suffirait à détruire la faible quantité d'antibiotique présente dans le milieu.

En réalité, une étude microbiologique plus précise, entreprise dans le laboratoire de Bactériologie du Professeur Andrieu nous a rapidement fait entrevoir la complexité du problème.

Cet antibiotique, en effet, peut agir non seulement à la manière des sulfamides comme bactériostatique à des concentrations inférieures à celles qui provoquent l'action bactéricide, mais il peut aussi, à des concentrations plus faibles, ne pas inhiber la pousse microbienne. Il va alors la retarder ou entraîner des modifications importantes des caractères du germe lui conférant une morphologie atypique, une affinité tinctoriale différente, des caractères biochimiques anormaux en culture, rendant par conséquent l'identification bactériologique très délicate.

Il est inutile d'insister sur les inconvénients graves de ces constatations si fréquentes aujourd'hui : l'imprécision des résultats fournis par le laboratoire ou, tout au moins, le retard apporté pour donner le critère bactériologique de certitude. Il en résulte souvent, pour le médecin traitant, l'impossibilité de porter un diagnostic étiologique précis et de contrôler l'efficacité

de la thérapeutique durant l'évolution de l'affection. Au cours de la Maladie d'Osler, par exemple, il est intéressant de suivre, par des hémocultures répétées, l'action antibactérienne de la médication, mais une hémoculture négative, même pratiquée lors d'un acmé fébrile, permet-elle d'affirmer que le sang est stérile ? N'est-il pas légitime de penser que la pénicilline présente dans le sang au moment du prélèvement, a suffi à inhiber la pousse, sans pour cela tuer le germe qui persiste encore dans le sang du malade ?

Le problème se trouve donc posé sur le plan de la Bactériologie Clinique d'un procédé susceptible de supprimer cette action modificatrice de la Pénicilline sur les germes, lors de la mise en culture d'un produit organique provenant d'un malade soumis à la pénicillinothérapie. A priori, deux ordres de solutions paraissent possibles :

1° Neutraliser l'action de la pénicilline en faisant intervenir un antagonisme biologique analogue à celui de l'acide para-amino-benzoïque vis-à-vis des sulfamides.

2° Détruire la pénicilline elle-même, mais sans pour cela tuer les germes présents quelquefois particulièrement fragiles et abîmés par le traitement. Il s'agit donc de faire intervenir une substance détruisant la pénicilline, mais n'exerçant pas une action antibiotique ou même simplement empêchante de la pousse microbienne.

La première hypothèse n'a pas encore reçu de confirmation sur le plan pratique, les connaissances actuelles sur le mode d'action des antibiotiques en général et de la pénicilline en particulier n'ont pas encore permis d'apporter une réponse de cet ordre.

La deuxième hypothèse fera surtout l'objet de notre étude. Nous avons été amenés à constater que le

problème qu'elle soulève dépasse de beaucoup, dans sa portée, celui de la technique bactériologique pour soulever dans une certaine mesure la question, d'une brûlante actualité, de la pénicillino-résistance. Nous nous sommes principalement attachés à faire le point des travaux récents français et surtout anglo-saxons relatifs à cette question.

Nous avions espéré pouvoir mener à bien un travail original dans ce domaine. Les grosses difficultés matérielles de tous ordres, inhérentes aux circonstances actuelles et notre insuffisance sur le plan biochimique, nous ont empêchés de donner à la partie expérimentale l'ampleur qu'elle aurait méritée et nous avons dû nous contenter de nous familiariser avec les méthodes étrangères, de reprendre certains des résultats avancés par les auteurs, en essayant d'en préciser la technique et la portée.

Dans une *PREMIERE PARTIE*, nous présentons donc une étude énumérative des différents facteurs qui peuvent être considérés comme *Antipénicillines*. Nous critiquerons rapidement les moins importants d'entre eux pour nous attacher plus particulièrement à celui qui, nous ayant paru actuellement le plus intéressant, a principalement retenu notre attention : *la Pénicillinase*. Nous nous efforcerons d'en préciser les caractères essentiels.

Dans une *DEUXIEME PARTIE*, nous essaierons de montrer la portée de cette notion d'Antipénicilline et notamment de la connaissance de la Pénicillinase.

Sur le *plan pratique* d'abord, nous verrons dans quelle mesure elle constitue une réponse satisfaisante au problème posé au Laboratoire Clinique, lors de l'examen bactériologique de produits organiques provenant de sujets soumis à la pénicillinothérapie. Nous rapporterons les résultats des examens pratiqués en

collaboration avec M^me^ le docteur ENJALBERT au Laboratoire de Bactériologie du Professeur ANDRIEU, sur les prélèvements provenant de malades en traitement dans les Hôpitaux de Toulouse.

Nous serons amenés à constater que la Pénicillinase intervient d'ailleurs dans la compréhension d'autres problèmes de Biologie Clinique et de Thérapeutique anti-infectieuse.

Sur le *plan théorique* aussi, elle nous amènera à reconsidérer la question de la sensibilité des germes à la pénicilline, l'insensibilité relative de certaines espèces, la résistance naturelle ou acquise de certaines souches d'espèces réputées pénicillino-sensibles. Malgré le caractère encore assez vague de nos réponses, il y a là un facteur important qui pèse sur tout l'avenir de la Pénicillinothérapie et au sujet duquel une tentative de mise au point nous a paru souhaitable.

C'est au cours de notre exposé que nous serons parfois amenés à faire état de certains de nos résultats personnels : nous le ferons au fur et à mesure de notre développement, et d'une façon très succincte, afin d'éviter la lecture fastidieuse d'une succession de résultats expérimentaux.

Nous tenons, au préalable, à remercier M. le Professeur BUGNARD de l'intérêt bienveillant qu'il a porté à ce travail et de la subvention accordée par l'Institut National d'Hygiène au Laboratoire, pour nous aider à acquérir le matériel de verrerie indispensable.

Nous avons, au début de notre expérimentation, rencontré pour nos dosages de très grosses difficultés du fait de l'irrégularité des Pénicillines utilisées. Il s'agissait alors de flacons de Pénicillines colorées, dont la composition chimique, la pureté, l'activité, la validité variaient avec les marques et avec les lots. Depuis

quelques mois, nous avons pu éliminer cette grande cause d'erreur grâce à l'utilisation de flacons de Pénicilline blanche, de composition chimique définie, pure, d'activité constante, grâce à l'extrême obligeance de la Maison Specia, qui a mis à notre disposition un stock important de Spécilline G. Nous tenons à la remercier, ainsi que notre ami, le docteur Cazaux, pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée.

PREMIÈRE PARTIE

LES ANTIPENICILLINES

LES ANTISEPTIQUES

Depuis les travaux de Fleming et des chercheurs de l'Ecole d'Oxford, on sait qu'il est facile de détruire ou d'inactiver la pénicilline à l'aide nombreux agents chimiques : acides, bases, métaux lourds, alcools concentrés; mais il ne saurait être question, dans le cas qui nous occupe, d'avoir recours à de tels réactifs puisque l'on cherche à faciliter la culture de germes microbiens parfois extrêmement fragiles; l'addition de toute substance ayant une action antiseptique, même faible, est à rejeter.

LA CHALEUR

Une idée, par contre, qui vient tout naturellement à l'esprit, est de mettre à profit la classique instabilité de la pénicilline à la chaleur.

On sait qu'un facteur important conditionnant la stabilité de la pénicilline est la présence d'eau ou d'humidité, celle-ci augmentant l'effet agressif de la chaleur ou des variations de pH. Cela est vrai, notamment pour les sels de sodium de pénicilline, préparations qui sont les plus couramment utilisées en France.

A l'état sec, les premières préparations de pénicilline-sodium de fabrication américaine, devaient être conservées au-dessous de 15°. Par la suite, les travaux sur la stabilité à la chaleur de la pénicilline-sodium en poudre ont donné des résultats variables, probablement en raison de la composition chimique et du degré de pureté différents suivant les échantillons étudiés. On sait que la pénicilline-sodium G,

obtenue à l'état pur (1600 u/mg.), supporte deux heures de chauffage a 100° alors que les préparations colorées diminuaient d'activité au-dessus de 15° et étaient presque entièrement détruites à 56°.

En solution aqueuse, la stabilité est conditionnée par la température et le pH. Le pH 6,5 serait optimum.

Kirby (71) a montré que des solutions de pénicilline-sodium réalisées à partir de préparations commerciales colorées américaines et contenant 1 U.O./c.c. se conservent une semaine à 22° sans signes d'altération et que la plupart des lots peuvent ainsi être gardés dix à douze jours. A 37° cependant l'activité complète n'est maintenue que quatre jours seulement.

En réalité, compte tenu de l'état de pureté de la préparation de pénicilline, la stabilité en solution semble varier dans une proportion importante avec la nature du solvant.

J. A. de Loureiro et E. Lito (84) recherchant l'effet de quelques substances en solution sur la stabilité de la pénicilline conservée à l'étuve à 37° arrivent à des résultats assez inattendus.

En eau distillée, la puissance diminue de 50 % en quatre jours, de 100 % en dix jours.

Les sels neutres accélèrent la destruction, la solution physiologique de *chlorure de sodium* est nettement agressive : diminution d'activité de 50 % en trente-six heures.

Parmi les sucres, le plus actif est le *Saccharose* en solution à 30 %; la puissance diminue de 50 % en six heures, à 37°, et en quarante-huit heures à la glacière; le glucose en solution à 30 % a un effet moindre : diminution de 50 % en quarante-huit heures à 37°.

R. J. V. Pulvertaft et J. Yudkin (106) ont rapporté le pouvoir protecteur des *Phosphates* : en solution tampon phosphatée, un échantillon de pénicilline ne perd que 5 % de sa puissance par chauffage à 100° C. pendant quinze minutes alors qu'en solution aqueuse il perd au moins 50 %. Il est regrettable que ces solvants ne puissent être injectés par voie parentérale et que l'on doive réserver leur utilisation thérapeutique à la préparation des pommades à la pénicilline.

L. Hahn, plus récemment (54) (55), a mis en évidence

l'action stabilisante du *Citrate de Soude* tout particulièrement lorsqu'il est associé à du chlorure de sodium. Cet effet serait encore supérieur à celui des phosphates. La pénicilline en solution citrate-chlorure de sodium pourrait être portée à l'ébullition pendant une heure et se conserver ensuite à la température ordinaire pendant des mois.

Il semble qu'il y ait là une application intéressante pour le laboratoire de microbiologie : la possibilité de conserver en stock des solutions de pénicilline titrées utilisables pour les tests usuels de pénicillino-sensibilité d'un germe ou la gamme comparative d'un dosage de pénicilline dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien.

EXPÉRIMENTATION PERSONNELLE

Avant d'aborder un travail expérimental sur les anti-pénicillines, nous avons essayé de préciser la stabilité des solutions de pénicilline en fonction de la concentration en substance active, de la nature du solvant, de la durée et de la température de conservation.

Nous avons utilisé, pour ces essais, différentes pénicillines de fabrication étrangère (Merck, Winthrop, Ayerst, Squibb, Heyden, Wieth, Bristol, Schenley) et de la pénicilline G. blanche (C.S.C. et spécilline G.) Toutes sont des préparations de pénicilline-sodium. Les tests ont été pratiqués à des concentrations variables (10.000, 1.000, 100, 10, 1 et 0,1 U.O./c.c.) et dans différents solvants.

Nous ne rapporterons pas les résultats détaillés et nous nous bornerons à des déductions générales :

1° Il semble que les pénicillines colorées soient comparativement plus stables *en solution* que la pénicilline G. blanche. Ce fait contraste avec la stabilité de cette dernière à l'état sec et il conduit à penser que certaines des impuretés contenues dans les préparations colorées peuvent avoir un effet protecteur sur l'instabillité en solution de la pénicilline elle-même;

2° La perte d'activité de la pénicilline en solution paraît, dans le cadre de nos essais, dépendre non seulement du temps, de la température et de la nature de la dilution (composition chimique et pH) mais aussi de la concentration de pénicilline. Il semble que les solutions con-

centrées de titre élevé perdent proportionnellement davantage de leur acitivité que les solutions faibles.

Voulant rester sur le plan du laboratoire clinique, nous nous limiterons à la question de la stabilité de la péniciline contenue dans les produits organiques ou les milieux ensemencés à partir de ces exsudats et nous ne préciserons ici qu'une seule série d'expériences.

Nous avons recherché la perte d'activité après vingt-quatre heures d'étuve à 37° d'une solution de pénicilline G à 10 U.O./c.c. (Spécilline G, lot 1301, Exp. : déc. 1950, 1600 u./mg.) dans différents solvants.

La technique la plus rigoureuse aurait été de mesurer la puissance résiduelle par la méthode de diffusion en gélose type Heatley et de comparer les diamètres d'inhibition à la courbe standard. Nous avons préféré, pour des raisons de simplification de technique, utiliser la méthode des dilutions qui, bien que moins précise, donne cependant une idée assez nette de l'importance de l'activité antibiotique de chaque échantillon. Le germe test — comme dans tous nos titrages ultérieurs — est le *Staphylococcus Aureus H* (Souche Londres N.T.C.T. 6571) et le milieu choisi celui proposé par B. Sureau (Eau peptonée-Glucose-P.S.P.) qui nous a donné toutes satisfactions. Nous inoculons 0,1 c.c. d'une culture de dix-huit heures en bouillon de *St. Aureus* dans 10 c.c. de milieu (Tableau I).

Technique

TABLEAU I

Dosage de la pénicilline résiduelle par la méthode des dilutions

TUBES A HEMOLYSE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Milieu Glucose-P.S.P. ensemencé St. Aureus 10^{-2}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution de pénicilline étudiée	I. On passe 1 cc. du mélange du 1er tube dans le 2e, du 2e dans le 3e et ainsi de suite jusqu'au 10e; on jette alors 1 cc. et le 11e tube sert de témoin.										
Taux final de dilution	$\frac{1}{2}$	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0

Après vingt-quatre heures d'étuve à 37°, il est facile d'apprécier la pousse grâce au virage de l'indicateur coloré et au trouble apparaissant dans le milieu. On retient le dernier tube limpide resté rose comme taux minimum de dilution inhibiteur et on compare avec la gamme témoin. Celle-ci est réalisée à partir d'une solution faite extemporanément en eau distillée et diluée suivant la même technique (Tableau II).

TABLEAU II

Gamme témoin

TUBES A HEMOLYSE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Taux de dilution....	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	0
Concentration de P. U.O./c.c. (environ).	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0
Lecture après 24 h. à 37°.....	—	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++

A lire le tableau III, il semble que :

Une solution de pénicilline à 10 U.O./c.c. en *eau distillée* ne perd que peu ou pas de son activité antibiotique sur le staphylocoque étalon par un séjour de vingt-quatre heures à 37°.

Les sels (chlorure de sodium, citrate de sodium, phosphates) entraînent une diminution notable d'activité. A ce propos, nous ne retrouverons pas sur la pénicilline G l'effet protecteur des phosphates rapporté par Pulvertaft et Yudkin (106) mais comme ces auteurs ont travaillé sur des pénicillines colorées impures et que nous ne rapportons que des tests sur des pénicillines blanches, il est possible que là aussi des impuretés de la préparation puissent jouer un rôle. Par contre, le mélange Citrate-ClNa proposé par Hahn (54-55) paraît avoir, en effet, un rôle stabilisant que l'on retrouve à d'autres concentrations et pour des périodes de conservation différentes.

Les milieux bactériologiques usuels (eau peptonée, bouillon glucosé) ne paraissent pas très agressifs en vingt-quatre

TABLEAU III

Résultats

SOLVANT	TAUX DE DILUTION MINIMUM INHIBANT LA POUSSE du Staphylococcus Aureus H		
Eau distillée	1/256		
Chlorure de sodium 9 %		1/128	
Tampon phosphaté PH7			1/64
Citrate de sodium 2 %			1/64
Citrate ClNa (Citrate Na 2 % 2 cc ClNa 9 % 8 cc)	1/256		
Eau peptonée Difco	1/256		
Bouillon glucosé		1/128	
Sérum humain			1/64
Bouillon glucosé + Sérum (B. glucosé 9 cc, Sérum 1 cc)	1/256		
Sang citraté (Sang humain 8 cc Citrate Na 2 % 2 cc).		1/128	
Bouillon glucosé + sang citraté (B. glucosé 9 cc — Sang citraté 1 cc)			1/64
Liquide céphalo-rachidien (Alb. 0,30).	1/256		

heures à 37° sur une solution de pénicilline à 10 U.O./c.c. *Les liquides organiques* ont une influence variable, mais ce qui nous paraît important, c'est le fait que le mélange réalisé lors de l'ensemencement d'un tel produit pénicilliné sur un milieu nutritif conserve un pouvoir antibiotique très notable après vingt-quatre heures d'incubation à 37°.

Il ne faut donc pas compter sur le séjour à l'étuve, lors de la mise en culture pour assurer la disparition complète

du pouvoir antibiotique des échantillons contenant de la pénicilline et ajoutés aux milieux bactériologiques usuels.

LES EXTRAITS TISSULAIRES

Dès le début de leurs travaux, les chercheurs de l'Ecole d'Oxford (1) ont étudié l'action des extraits et des autolysats tissulaires sur le pouvoir antibiotique de la pénicilline.

On sait, depuis les travaux de Mac Leod que l'action bactériostatique des sulfamides est inhibée par la présence de constituants cellulaires et de pus.

Or, à l'inverse des dérivés sulfamidés, l'activité de la pénicilline n'est pas affectée de façon notable par le *sérum*, le *sang*, le *pus*, les produits d'*autolyse tissulaire*. Il y a donc là une supériorité certaine de la pénicilline sur les sulfamides au point de vue chimiothérapique.

Gardner (46) a montré que le pus staphylococcique ne possède aucune action inhibitrice sur la pénicilline, mais par contre, il a noté une légère inhibition avec un pus provenant d'une cystite à colibacilles. Nous verrons plus loin une explication, qui paraît pleinement satisfaisante, de ce phénomène.

Bigger a insisté sur le fait que le sérum humain pourrait inhiber en partie l'action de la pénicilline; il attribue ce phénomène à l'absorption, au niveau du tube digestif, d'inactivateurs de la pénicilline. Nous serons amenés à revenir sur ce point.

Himes et White (61) ont étudié l'action sur la pénicilline d'un certain nombre de substances : facteurs de croissance, acides aminés, hydrates de carbone, phospholipides, purines, extraits tissulaires. Aucun de ces produits n'a manifesté une action destructrice ou inhibitrice. Par contre, des extraits et des filtrats de cultures microbiennes diverses leur ont parfois donné des résulats appréciables.

L'ACIDE PARA-AMINO-BENZOÏQUE

Tous les auteurs admettent aujourd'hui que la pénicilline n'agit que sur les germes en voie de division ou possédant tout leur potentiel de multiplication. La pénicilline

n'a pas d'effet sur les bactéries en suspension dans un milieu non nutritif tel qu'un bouillon épuisé ou une solution salée physiologique mais elle a l'action bactéricide la plus puissante en milieu nutritif dans lequel les bactéries pourraient se mutiplier en l'absence de pénicilline. Hobby et Dawson (64) montrent que :

— Les conditions qui augmentent la vitesse de croissance des germes augmentent la vitesse d'action de la pénicilline.

— Inversement, les conditions qui diminuent la vitesse de croissance des germes diminuent la vitesse d'action de la pénicilline.

— C'est donc au cours de la multiplication active que la pénicilline est la plus efficace.

Or, on reconnaît classiquement aux *sulfamides* une action bactériostatique. On est donc en droit de penser que des germes soumis d'abord à leur action et secondairement exposés à la pénicilline ayant perdu, du fait de la bactériostase sulfamidée leur potentiel de multiplication, se trouveront donc protégés contre l'action bactéricide de la pénicilline.

En fait, il n'est en rien, bien au contraire : les sulfamides ont même, avec la pénicilline, une action synergique. Ungar, le premier, a montré, en 1943, que l'effet inhibiteur de la pénicilline sur les staphylocoques et les streptocoques est au moins doublé par la présence de sulfapyridine à une concentration insuffisante pour tuer les germes à elle seule. Bigger (13) démontre cette action synergique en bouillon comme en sérum et précise qu'elle est plus forte pour le sulfathiazol que pour le sulfanilamide ou la sulfapyridine.

Ces résultats paraissent troublants si l'on admet que les sulfamides ont une action purement bactériostatique. Mais Chain (27) reprenant les travaux des auteurs hollandais Wolf et Julius, a montré *que, comme la pénicilline, les sulfamides ont une action bactéricide vraie sur les germes en milieu nutritif.*

Etant donné cette synergie antibactérienne sulfamide-pénicilline, l'*acide para-amino-benzoïque* antisulfamide par excellence se comporte-t-il aussi comme un antipénicil-

line? Ungar rapporte, en 1943, l'action synergique de l'acide para-amino-benzoïque et de la pénicilline; Hobby et Dawson (63) (65) démontrent qu'il *augmente la vitesse d'action de la pénicilline.*

CLARASE - TAKADIASTASE

De grands espoirs ont été fondés sur l'activité anti-pénicilline de deux enzymes : la *Clarase* et la *Takadiastase*, provenant d'un champignon *Aspergillus Orizaœ.*

Lawrence, en 1943 (75), rapporte que la pénicilline peut être inactivée par la Clarase et la Takadiastase et note l'intérêt de cette découverte pour le test de stérilité de la pénicilline.

Quelques temps après, Stanley (120) reprenant ses expériences aboutit à des résultats très variables suivant le lot de préparations enzymatiques utilisé et conclut prudemment que dans la pratique du test de stérilité chaque échantillon de Clarase doit être éprouvé, au préalable, de façon à préciser l'existence et le degré de son pouvoir inhibiteur.

Lawrence (76) reprenant ses propres travaux, précise que les préparations enzymatiques qui se sont révélées actives contre l'antibiotique contenaient, en plus des substances hydrosolubles, filtrables, d'origine bactérienne, les micro-organismes en cause étant des germes sporulés de l'air du groupe du *Bacillus Subtilis.* Il conclut que le *le pouvoir attribué à la Clarase et à la Takadiastase est dû à des produits bactériens résultant de souillures de ces préparations.*

LA CYSTÉINE

Dans une note préliminaire sur l'inactivation des antibiotiques, Cavallito et Bailey, en 1944 (23), rapportent que la *Cystéine* inactive diverses substances antibactériennes dont la pénicilline. Ils mettent cette propriété en évidence (24) par la méthode des disques de papier buvard imprégnés du mélange Pénicilline-Cystéine et déposés à la surface d'une boîte de gélose ensemencée avec du staphylocoque. Par la suite, étudiant l'aspect biologique de cette inactivation, ils constatent (4) par la technique de Warburg

que la respiration bactérienne suspendue sous l'action de l'antibotique ne l'est pas par le mélange de pénicilline et de cystéine.

Woodruff et Foster, Chow et Mac Kee (29) notent également que la pénicilline mise en contact avec du chlorhydrate de cystéine perd rapidement son activité antibiotique. Précisant le mécanisme chimique de cette inactivation, ils constatent que le taux de l'inactivation dépend du pH; il augmente avec l'alcalinité; il semble donc qu'il s'agisse d'une réaction chimique dans laquelle l'antibiotique réagirait avec le groupement-SH. Cavallito et Mac Kee (29) ont montré que la cystéine peut être remplacée par ses esters méthyliques ou éthyliques mais non par S-méthylcystéine, la méthionine ou la sérine. L'action du glutathion, de l'acide thioglycollique est beaucoup plus faible ou nulle, un groupe-SH libre paraît donc essentiel pour cette destruction. Il semble donc, pensent ces auteurs que dans l'action de la cystéine intervienne encore un facteur supplémentaire en plus du groupement-SH.

Cette notion de l'action antipénicilline de la cystéine est très intéressante pour la pratique du test de stérilité. On a fondé sur elle de grands espoirs pour la destruction de la pénicilline présente dans les produits biologiques destinés à l'examen bactériologique.

Or, Hirsh et O'Neil (62) dans une étude expérimentale très précise ont montré, en 1946, l'impossibilité pour la cystéine d'inactiver la pénicilline en présence de bouillon et de sang : 10 milligrammes de chlorhydrate de cystéine inhibent bien 50 U.O. de pénicilline en eau physiologique mais cette inactivation ne se produit pas en présence de bouillon, de sang, ou lorsque le pH du milieu est de l'ordre de 4.

Muir et Valley (95), Hickey (60) pratiquent cette inactivation en bouillon au thioglycollate mais ils laissent agir leur mélange pénicilline-cystéine pendant un certain temps — quinze à soixante minutes — avant d'ajouter le mélange au bouillon. En pratique de bactériologie clinique, la chose est évidemment impossible; il y aura toujours du sang ou du pus dans le prélèvement.

D'ailleurs, Bailey et Cavallito (4) étudiant dans un travail très récent la réversibilité de l'action antibactérienne

notent que la bactériostase produite par le chlorure de mercure ou la gliotoxine peut être rendue réversible par l'addition de cystéine au système bactériostatique, mais qu'au contraire la bactériostase produite par la pénicilline, la streptomycine ou la pyocyanine, n'est pas réversible par la cystéine.

LA PÉNICILLINASE

Dès 1929, Fleming avait constaté que la pousse de *Escherichia Coli* et de nombreux autres bacilles du groupe colityphique n'était pas inhibée par la pénicilline.

Abraham et Chain (1) étudiant, en 1940, la cause de cette pénicillino-résistance obtiennent en triturant dans un mortier une suspension bactérienne de colibacilles une substance qui neutralise la propriété antibiotique de la pénicilline.

Ces auteurs notent que cette destruction de la pénicilline se produit rapidement à l'étuve à 37° C., plus lentement à la température ordinaire. Ils vérifient cette perte de l'activité antimicrobienne en titrant la pénicilline résiduelle par la méthode de diffusion en gélose.

Ils concluent que la substance douée de cette activité antipénicilline est un enzyme — auquel ils donnent le nom de *Pénicillinase* — car elle est détruite par la chaleur à 90° C. pendant cinq minutes et par incubation à l'étuve en présence de papaïne. Elle ne dialyse pas à travers les membranes de cellophane, elle est précipitable par l'alcool mais perd ainsi beaucoup de sa puissance. Son activité, minime à pH 5, augmente vers l'alcalinité, optima pour un pH compris entre 8 et 9, elle est instable au-dessus de pH 9. Ces auteurs notent que lors de l'inactivation de la pénicilline par la Pénicillinase on ne constate aucun dégagement d'oxygène, aucune apparition de groupements acides.

Recherchant la production d'une Pénicillinase intracellulaire par d'autres germes en utilisant la même technique, ils concluent par la négative en ce qui concerne une souche de *Staphylococcus Aureus* pénicillino-sensible. Par contre, ils trouvent des bacilles Gram-négatifs pénicillino-résistants qui sont producteurs de Pénicillinase.

Dans le cas d'un germe de l'air isolé comme souillure

d'une préparation de pénicilline, ils notent la présence de Pénicillinase dans le liquide de culture et montrent donc que cet enzyme peut être, au moins en partie, extra-cellulaire.

Par contre, les mêmes auteurs soulignent la production de Pénicillinase par un germe pénicillino-sensible *M. Lysodeikticus;* ils estiment donc que la présence ou l'absence de cet enzyme chez une espèce bactérienne n'est pas le seul facteur qui conditionne la sensibilité ou la résistance du germe à la pénicilline.

Cette publication des deux chercheurs de l'Ecole d'Oxford constitue le premier travail consacré à la Pénicillinase. Depuis, de nombreux savants se sont consacrés à cette question. En Angleterre, en Amérique, en France, les efforts se sont multipliés pour essayer de préciser les conditions de production, les caractères et l'activité de ce nouveau facteur antipénicilline.

Nous passerons rapidement en revue ces différents travaux et nous apporterons enfin notre modeste contribution personnelle.

I. — Conditions de production

A. PENICILLINASE COLIBACILLE

Harper, en 1943 (56) rencontre pour l'étude bactériologique des blessures de guerre traitées par la pénicilline des difficultés en raison de la persistance de l'antibiotique au niveau de la plaie. Ausssi, pour détruire la pénicilline présente, il reprend les travaux de Abraham et Chain (1) et recherche de façon systématique, chez les germes pénicillino-résistants de l'air, la propriété d'élaborer une Pénicillinase.

Sa technique, toujours la même, consiste, partant d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose, à pratiquer une suspension bactérienne en eau distillée qui est ensuite précipitée par l'acétone et l'éther. Après centrifugation et dessiccation sous vide, on obtient une poudre blanche, dont l'activité antipénicilline est appréciée par la méthode des dilutions en série. Des tubes de 5 c.c. de bouillon pénicilliné

à raison de 10 U.O./c.c. sont ensemencés chacun par 0,2 c.c. d'une culture de dix-huit heures en bouillon de *Staphylococcus Aureus*. On lit la dose minima inhibitrice après quinze heures d'étuve à 37°.

Parmi les germes étudiés, Harper souligne que l'activité antipénicilline la plus marquée est présentée par un bacille Gram-négatif, fermentant glucose, mannite et lactose avec dégagement de gaz, ne produisant pas d'acétyl-méthylcarbinol, indologène et ne liquéfiant pas la gélatine. Il l'identifie comme un *B. Para-Coli*.

Les cultures vivantes, les filtrats, les préparations desséchées réalisées à partir de ce germe détruisent la pénicilline. Il s'agit donc d'un facteur antipénicilline qui est, au moins en partie, *extra-cellulaire*. Harper considère qu'il s'agit de la Pénicillinase, mais la préparation ainsi obtenue est relativement stable à l'état sec: elle se conserve cinq mois; en solution aqueuse, on ne constate, au bout de cinq semaines, à 2° C. ou à 15° C., aucune diminution d'activité.

W. et M. Smith (116) reprochent à la poudre bactérienne de Harper d'être insoluble, donc inutilisable, dans les milieux solides, gênante par son trouble dans les milieux liquides et de contenir parfois des germes persistants. C'est pourquoi ces auteurs ont recherché une méthode de production de Pénicillinase sous une forme stérile et stable. Comme Harper, ils utilisent une suspension bactérienne à partir d'une culture de vingt-quatre heures de *B. Para-Coli* sur gélose, mais ils la soumettent aussitôt à la dessication sous vide et c'est cette poudre microbienne desséchée qui est écrasée dans un mortier sec avec un peu de verre pilé pour être ensuite émulsionnée dans de l'eau alcalinisée à la soude à pH 9,5.

Après centrifugation et filtration on obtient un filtrat qui possède une activité antipénicilline élevée. Distribué en ampoules stériles, celui-ci est desséché sous vide; reconstitué en eau distillée au moment de l'emploi, il est absolument limpide et de puissance facile à préciser car il n'y a aucune perte d'activité ni pendant la dessication ni pendant la reconstitution.

La méthode d'extraction à partir des cellules bactériennes à l'état sec paraît d'un rendement très supérieur à celui de la méthode classique « humide ».

Reconstituée *en solution*, la Pénicillinase-Para-Coli ainsi obtenue est *thermolabile* à pH acide, neutre ou alcalin, et complètement inactivée par le chauffage trente minutes à 80° ou quinze minutes à 100°. A 60° cependant, elle paraît un peu plus stable à pH 8,1 qu'à pH 5,9. De toute façon, à 100° la perte d'activité est toujours complète; la conservation et la stérilisation paraissent donc impossibles sous cette forme.

Par contre, *à l'état sec*, la Pénicillinase-Para-Coli est très *thermostable*. Après un séjour de vingt minutes à l'autoclave, l'activité antipénicilline est identique à celle du témoin. Il y a donc là un procédé d'obtention d'une Pénicillinase *sèche*, *stable* et *stérile* qui paraît du plus haut intérêt. La reconstitution par addition d'eau donne une solution *limpide*, *stérile*, de puissance connue mais très instable à la chaleur sous cette forme.

R. Perault (98) (100) reprenant à l'Institut Alfred-Fournier, dans le service du Professeur C. Levaditi l'étude des antipénicillines d'origine microbienne, précise que la Pénicillinase-Coli peut être mise en évidence :

— Dans les filtrats de culture de *Escherichia Coli;*

— Dans les corps microbiens eux-mêmes.

1° Cet auteur démontre la présence du principe antipénicilline dans les *liquides de culture* débarrassés des corps microbiens :

— Soit par centrifugation puis ultrafiltration à travers des membranes de collodion;

— Soit par filtration sur amiante suivie de stérilisation par le chloroforme que l'on évapore ensuite sous le vide.

La production de cette Pénicillinase varie en fonction de différents facteurs :

— *La composition du milieu de culture :* l'élaboration faible ou nulle en milieu synthétique est appréciable (1 c.c. de filtrat neutralise 30 U.O.) en milieu moyennement riche en peptone, intense en milieu très riche (neutralisation de plus de 100 U.O. par c.c.);

— *La souche de E. Coli* utilisée;

— *La durée du séjour à l'étuve.* L'élaboration de Pénicillinase augmente avec le vieillissement de la culture à 37° et avec l'accroissement parallèle de l'alcalinisation du milieu.

2° Perault (100) met également en évidence la Pénicillinase-Coli dans les *corps microbiens* grâce à un procédé simple d'extraction par l'éther ou l'acétate d'amyle. Il montre ainsi qu'il s'agit d'un principe soluble dans l'eau et la solution tampon phosphatée, filtrable à travers l'amiante ou les filtres Seitz, adsorbé par le charbon actif, inaltéré par un contact prolongé avec l'éther ou le chloroforme, mais — à l'inverse de la Pénicillinase-Para-Colon d'Harper — détruit par l'acétone. Le Pénicillinase Coli est inactivée par la chauffage (deux minutes à 65° C.), elle ne dialyse pas.

Son activité réduite à pH 3 se maintient à pH neutre ou alcalin.

Son action consiste essentiellement en une destruction de la pénicilline; 1 c.c. de Pénicillinase obtenue par autolysat des corps microbiens détruit 250 U.O. de pénicilline.

Gorini et Torrriani (48) ont démontré que l'action antipénicilline des liquides de culture de *E. Coli* est due pour la plus grande part à un principe thermolabile paraissant d'origine enzymatique et accessoirement à un principe thermostable qui paraît avoir une action analogue à celle de la cystéine. Sur ces bases, les auteurs ont recherché une méthode de purification de la Pénicillinase. Ils ont adopté la technique de la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammoniaque.

Après sept jours d'incubation à 37°, les cultures de *E. Coli* en bouillon ordinaire sont tuées par l'addition de 0,25 % de phénol qui, à une telle concentration, n'influencerait ni l'activité de la pénicilline, ni celle de la Pénicillinase. Le culture refroidie à 0° et additionnée de sulfate d'ammoniaque est laissée douze heures à la glacière. Après centrifugation, filtration sur filtre Seitz, ce qui n'entraînerait aucune perte d'activité, on refroidit encore à 0° et on laisse en contact dix-huit heures à la glacière avec une solution de sulfate d'ammoniaque. A la suite d'un nouveau passage sur filtre Seitz, on obtient l'enzyme qui est purifié par dialyse avec de l'eau distillée.

La solution de Pénicillinase ainsi obtenue a un pH de 6

environ; elle est stable pendant deux mois à la température ordinaire mais inactivée par l'ébullition. Son activité est la moitié environ de celle du liquide brut.

Les auteurs italiens (49) ont remarqué que *E. Coli* ensemencé sur bouillon alcalinise le milieu — pH 8,5 environ — et produit de la Pénicillinase. Pour standardiser les conditions de production et de purification, ils ont essayé de cultiver le germe dans un milieu synthétique où la source azotée soit anorganique et où le glucose soit l'unique origine des hydrates de carbone. Ils ont constaté que, dans ces conditions, le métabolisme de *E. Coli* est modifié, le milieu devient acide (pH 5) et il n'y a pas formation de Pénicillinase. Or, l'enzyme étant stable à ce pH n'a pu être détruit; il n'a donc pas été élaboré par le germe.

Donc, la production de Pénicillinase ne paraît possible que si *E. Coli* est capable de porter le milieu dans lequel il vit vers l'alcalinité. D'ailleurs, si on neutralise par la soude l'acidité due à la pousse en milieu ordinaire ou synthétique, on ne peut mettre en évidence de Pénicillinase tant que le pH se maintient aux environs de 7, mais dès qu'il s'élève vers l'alcalinité, la formation de Pénicillinase apparaît.

B. PÉNICILLINASE SUBTILIS

Lawrence reprenant, en 1944 (76) sa publication un peu prématurée de 1943 (75) sur l'activité antipénicilline de la *Clarase* et de la *Takadiastase* établit que l'action inactivatrice attribuée à ces deux enzymes d'origine fongique est, en réalité, due à un ferment soluble produit par des germes de souillure du groupe de *B. Subtilis.*

Duthie (35) recherchant un procédé commode pour la pratique du test de stérilité de la Pénicilline et l'examen des prélèvements provenant de malades soumis à la pénicillinothérapie, entreprend l'étude de la production de principes antipénicillines par les germes du même groupe.

Sur six souches examinées, deux seulement (N.C.T.C. 6276 et 6347) élaborent une quantité importante de Pénicillinase extra-cellulaire. L'auteur précise les conditions de production et les propriétés du produit obtenu. La culture du *Bacillus Subtilis* est faite en ballon contenant 20 c.c. de bouillon. A la fin de l'incubation, le bouillon est neutra-

lisé, centrifugé et filtré. L'activité de la Pénicillinase obtenue est appréciée :

— Soit par la méthode de diffusion en gélose type « Oxford Cup »;

— Soit par la méthode des dilutions en série.

L'auteur peut ainsi étudier l'influence de différents facteurs sur la production de l'enzyme.

— Les résultats sont identiques si la croissance se fait à 26° C. et à 37° C.

— La composition de l'atmosphère gazeuse (oxygène, anhydride carbonique, mélange oxygène-anhydride carbonique) paraît ne pas intervenir.

— L'agitation continue semble accélérer la croissance.

— L'addition de pénicilline au milieu de culture au moment de l'ensemencement et même plusieurs jours après augmente le rendement en Pénicillinase d'une façon importante. Il s'agit donc, vraisemblablement, d'un *enzyme adapté*.

Les filtrats obtenus ont une activité telle qu'une dilution à 1/400 neutralise 11,5 U.O. de pénicilline par diffusion sur gélose et que 1/640 neutralise 25 U.O. en bouillon par la méthode des dilutions en série.

La stabilité de la préparation obtenue paraît être essentiellement fonction du pH. Après chauffage à 60° pendant quatre heures, on ne note aucune perte d'activité pour les pH compris entre 5,0 et 7,0; 50 % de perte à pH 8,0; 75 % à pH 4,0 et pH 9,0.

D'après Duthie, *vingt minutes d'ébullition à pH neutre n'entraîneraient aucune perte d'activité* de sa préparation de Pénicillinase-Subtilis.

Un certain degré de purification de la préparation peut être obtenu par dialyse, mais la filtration consécutive entraîne une baisse importante de l'activité.

Ungar (123) également préoccupé de la neutralisation de la pénicilline dans les échantillons adressés au Laboratoire de Bactériologie Clinique se tourne également vers la Pénicillinase et note que les préparations de Pénicillinase-Coli sont troubles et d'activité variable. Il isole une souche de

Bacillus Subtilis convenable et propose deux méthodes de production de la Pénicillinase Subtilis :

— L'une à partir des corps microbiens : suspension bactérienne en eau physiologique d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose, centrifugation, broiement des corps microbiens. Nouvelle suspension en eau distillée, centrifugation et filtration sur Seitz.

— L'autre à partir du liquide de culture; ensemencement sur bouillon à la papaïne; deux à trois jours d'incubation à 37° C. Filtration sur Seitz. 1/4 c.c. du filtrat ainsi obtenu neutralise 250 U.O. de pénicilline en une heure à la température ordinaire.

Etudiant les facteurs de production, Ungar (123) arrive aux mêmes conclusions que Duthie (25) en ce qui concerne le rôle de l'atmosphère gazeuse. Il précise que la présence de glucose ne joue aucun rôle, même pas par l'intermédiaire du pH plus faible du bouillon glucosé. Il insiste sur le fait que le rendement en Pénicillinase est en rapport avec l'importance du voile de la culture.

La Pénicillinase-Subtilis de Ungar se conserve sans altération pendant trois à quatre mois à la glacière; elle est en partie détruite par le chauffage à 80° pendant trente minutes. De plus, elle n'a aucun effet inhibiteur sur la pousse des germes.

Sureau et Boyer (121) (53) ont repris l'étude de la Pénicillinase-Subtilis à partir d'une souche de Ungar. Ils ont précisé les conditions de production de l'enzyme.

Ces auteurs ensemencent 250 c.c. de bouillon ordinaire avec 0,5 c.c. d'une culture de vingt-quatre heures de *B. Subtilis Ungar*. Après quatre jours d'incubation à 37°, neutralisation, centrifugation et filtration. Ils obtiennent ainsi couramment une Pénicillinase capable d'inhiber 2.000 U.O. de pénicilline par goutte dans 5 c.c. de milieu.

Le meilleur rendement est obtenu en bouillon glucosé à 2 ‰ dans un volume de milieu réduit mais avec une surface libre aussi étendue que possible. L'âge de culture optimum est de cinq jours.

En règle générale, l'intensité de la production enzymatique est fonction de la richesse de la culture. Ces auteurs

préfèrent la stérilisation sur bougie L3 qui retient un faible pourcentage de Pénicillinase mais donne une stérilisation plus parfaite que le filtre Seitz.

Les auteurs canadiens Le Page, Morgan et Campbell (79) ont abordé l'important problème de la production et de la purification de la Pénicillinase sur le plan biochimique.

Etudiant la production du principe antipénicilline par des germes différents sur des milieux de composition variable, ils obtiennent le meilleur rendement avec une souche de *Bacillus Cereus* (N.R.R.L. 569) cultivé en bouillon à l'extrait de viande dans des conditions d'aérobiose parfaite. L'isolement de la Pénicillinase dans le filtrat de culture est réalisé par adsorption sur « Hyflo Super Cel » et élution avec de l'eau ammoniacale, fractionnement par le sulfate d'ammoniaque à saturation, dialyse et dessication sous vide.

Les deux biochimistes américains Housewright et Henry (67) utilisant le même germe le cultivent sur deux milieux différents :

— Le classique milieu américain à la macération de maïs *Corn Steep liquor Medium*,
— Et un milieu mi-synthétique *Casamino Acid Basal Medium*.

Ils constatent que le rendement est accru par l'addition de pénicilline sodium (20 U.O./c.c.) au moment de l'ensemencement puis au bout de vingt-quatre heures. La durée d'incubation est de l'ordre de quatre-vingt-seize à cent vingt heures, la température optimum comprise entre 20° et 37° ; l'addition de facteurs de croissance n'a aucun effet sur le rendement en Pénicillinase. La filtration la plus satisfaisante est obtenue sur filtres de verre fritté. La méthode de purification qu'ils proposent comporte adsorption sur « Hyflo Super Cel » et élution consécutive.

En somme, cette méthode, très comparable à la précédente, en possède également la longueur et la complexité.

C'est pourquoi Morgan et Campbell (92) reprenant la question ont cherché à mettre au point une méthode simple et rapide de production et d'isolement de la Pénicillinase. Toujours, à partir de la même souche microbienne ils vérifient que le temps d'incubation peut être réduit à quarante-

huit heures par la pratique de l'addition de pénicilline au milieu de culture. Celle-ci n'agit pas par un effet lytique sur les cellules bactériennes — ceci n'est vrai qu'avec les pénicillines colorées impures et n'est pas confirmé avec la pénicilline G blanche —, mais elle joue un rôle de « substrat » pour cet enzyme adapté. L'addition de pénicilline est faite au bout de trois, cinq, sept et neuf heures de façon à réaliser des concentrations finales respectivement égales à 1, 4, 10 et 25 U.O./c.c.

Il y a intérêt à utiliser, comme milieu, le bouillon additionné de 1 à 2 ‰ de glucose de façon à éviter l'alcalinisation et à maintenir le pH aux environs de la neutralité.

Dans ces conditions, on obtient, au bout de quarante-huit heures d'étuve à 22 - 26° sous aération rapide, un liquide qui, après ultra-filtration révèle une activité antipénicillinè importante. Le procédé proposé par ces auteurs pour la purification et considéré par eux comme simple consiste dans la précipitation de l'enzyme par l'acide acétique à un pH de 4,5 environ et sa récupération consécutive par l'eau ammoniacale après filtration sur filtre de verre fritté. On pratique ensuite la précipitation par le sulfate d'ammoniaque à saturation, la dialyse et la dessication sous vide.

II. – Etude de l'activité

TITRAGE DE LA PÉNICILLINASE

Pour étudier l'activité antipénicilline et titrer les préparations de Pénicillinase, de nombreuses techniques ont été proposées; toutes peuvent se résumer dans ce principe directeur : faire agir la Pénicillinase sur une quantité déterminée de pénicilline et évaluer l'activité antibiotique de la pénicilline résiduelle par l'une des méthodes classiques : diffusion en gélose type Heatley ou dilution en série type Oxford.

Les procédés divergent dans le détail suivant qu'on laisse ou non le mélange Pénicilline-Pénicillinase, réagir avant d'ensemencer le germe-test pénicillino-sensible, suivant qu'on met en présence d'une quantité constante de

Pénicillinase des dilutions croissantes de pénicilline ou inversement.

Nous nous contenterons d'exposer les grandes lignes de ces méthodes :

Harper (56) réalise des dilutions en série dans l'eau distillée de sa poudre de B. Para-Colon qu'il met en présence de 5 c.c. de bouillon contenant 10 U.O. de pénicilline aussitôt ensemencé avec 0,02 c.c. d'une culture de dix-huit heures en bouillon de *Staphylococcus Aureus*. Les lectures sont faites après dix-huit heures d'incubation à 37°.

Mac Quarrie et Liebmann (86) font agir des quantités variables de Pénicillinase diluée dans 10 c.c. de solution tampon (pH 7) sur 1 c.c. de pénicilline (50 U.O./c.c.). Après une heure de contact à 37°, la pénicilline résiduelle est titrée par la méthode Heatley. Dans ces conditions, les auteurs définissent une *unité de Pénicillinase : « C'est la quantité d'enzyme qui, dans 11 c.c. d'une solution à pH 7,0 contenant 50 U.O. de pénicilline détruit en une heure, à 37°, une quantité de pénicilline égale à 57,5 0/0 de la pénicilline récupérée dans le témoin.* »

Perault (98) laisse également le mélange Pénicilline-Pénicillinase une heure en contact à 37° mais ensuite il inactive l'enzyme par chauffage deux heures à 70° et titre la pénicilline résiduelle par l'une des méthodes classiques.

Sureau et Boyer (121), Morgan et Campbell (92), W. et M. Smith (116) proposent des techniques par dilution assez comparables, mais les derniers remarquent qu' « en l'absence d'une définition précise et uniformément admise de l'unité de Pénicillinase, les déterminations faites par des méthodes différentes ne peuvent être comparées et l'expression de l'activité sous forme du nombre d'unités de pénicilline inactivées par un volume donné est sans aucun sens, sauf dans le cadre d'une série de tests comparatifs réalisés suivant la même méthode. »

En somme, à part cette prudente réserve des chercheurs anglais, tous les auteurs admettent implicitement qu'il y a une relation de proportionnalité entre la quantité de pénicilline détruite et la quantité de Pénicilinase présente.

Or, Hunwicke (68) remarque que l'aptitude du staphylocoque à pousser en bouillon additionné de pénicilline inactivée est limitée à une certaine concentration de l'antibiotique. Cet auteur avait l'habitude de titrer sa Pénicillinase en ajoutant des quantités croissantes d'une dilution à 1/20 de Pénicillinase à des tubes de bouillon contenant chacun 4.000 U.O. de pénicilline. Après ensemencement par un staphylocoque sensible et incubation à 37°, la lecture est faite ou bout de quarante heures. Or, une fois, il commence par erreur le dosage avec 20.000 U.O. de pénicilline au lieu de 4.000, la pénicilline est alors diluée à 1/4 au lieu de 1/20 en pensant que le résultat ne sera pas modifié puisque la proportion Pénicilline/Pénicillinase dans chaque tube restera inchangée.

Dans ces conditions, tous les tubes restent stériles alors qu'avec la technique habituelle le tube de croissance limite se situe vers le milieu de la rangée.

Etudiant dans le détail cette anomalie troublante, Hunwicke arrive à préciser par une série d'expériences complémentaires les faits suivants :

1° Dans les séries contenant des concentrations élevées de pénicilline, les premiers tubes contiennent une quantité de Pénicillinase suffisante pour détruire la pénicilline, mais la pousse est cependant inhibée par des impuretés apportées par la préparation de pénicilline; ce point est démontré par le chauffage à 100° de la solution de pénicilline qui détruit l'antibotique proprement dit mais laisse persister le pouvoir inhibiteur surajouté. Cette cause d'erreur n'intervient d'ailleurs qu'avec les préparations colorées de faible puissance et est éliminée dans les préparations récentes hautement purifiées.

2° Mais même en présence de pénicilline purifiée à de faibles concentrations, le taux de pénicilline nécessaire pour neutraliser l'effet antibiotique ne peut être donné par une simple division.

Il semble que la Pénicillinase n'agisse pas proportionnellement à sa concentration et que la relation entre l'activité de la Pénicillinase et la concentration de pénicilline ne soit pas d'ordre linéaire.

Welsch (127) a apporté une démonstration irréfutable de l'exactitude de cette hypothèse.

Expérimentant sur une Pénicillinase-Subtilis préparée suivant la technique de Dutilh, il procède à des titrages par la méthode des dilutions en série. Il ensemence le mélange : 0,1 c.c. d'une dilution de pénicilline et 0,8 c.c. de bouillon avec un *Staphylococcus Aureus* et lit la croissance après dix-huit heures, un, deux, trois, quatre, cinq jours d'incubation à 37°. Ses conclusions sont formelles et s'accordent très bien avec la conception de la nature enzymatique de la Pénicillinase.

1° Le rapport de la pénicilline détruite en un temps donné à la dilution maximum de Pénicillinase nécessaire pour obtenir ce résultat est loin d'être constant.

2° La destruction de la pénicilline par les Pénicillinases peu activées ou fortement diluées procède très lentement. Une culture restée longtemps stérile peut présenter une croissance soudaine après quatre à six jours d'incubation. Ce phénomène s'observe d'ailleurs également en l'absence de Pénicillinase en présence d'une culture contenant une quantité très faible de pénicilline.

La conséquence pratique s'impose : *la quantité de Pénicillinase qu'il convient d'introduire dans les milieux destinés à la mise en culture de produits pathologiques contenant de la pénicilline ne peut être calculée par une simple règle de proportionnalité. La dose limite capable d'inactiver en douze à dix-huit heures la quantité de pénicilline vraisemblablement présente doit être déterminée expérimentalement.*

F. Grumbach et Boyer (52) ont vérifié cette notion importante. Suivant la méthode classique des dilutions, ils expriment habituellement le titre de Pénicillinase par le nombre d'unités de pénicilline inactivées par 0,05 c.c. de filtrat dans 5 c.c. de milieu. Mais en raison des titres élevés des Pénicillinases qu'ils obtiennent et devant l'obligation d'utiliser pour ce titrage des doses considérables de pénicilline, ils ont mis au point une méthode de diffusion en gélose qui leur permet de n'utiliser que des quantités beaucoup plus faibles.

Le principe est simple : on ensemence des boîtes de gélose pénicillinée à 0,1 U.O./c.c. avec du staphylocoque doré. Dans les cylindres, on place les Pénicillinases à titrer et une préparation de titre connu sert d'étalon. Après vingt-quatre heures d'étuve à 37°, on obtient, à l'inverse de la méthode Heatley, autour des cylindres des zones circulaires de croissance du staphylocoque d'autant plus grandes que la Pénicillinase est plus active.

Le diamètre des cercles de culture permet d'apprécier le titre de la Pénicillinase par rapport au diamètre des cercles de Pénicillinase de titre connu.

Ces auteurs établissent ainsi une courbe allant de 10 à 20.000 unités très comparable à celle de la pénicilline et utilisable en pratique entre 0 et 10.000 unités.

Pour des titres plus élevés, il faut diluer les préparations.

Vérifiant ici la règle de non-proportionnalité, ils proposent des coefficients de correction à faire intervenir pour chaque dilution. Ainsi pour :

Une dilution à 1/2, il faut multiplier le titre par 3;
Pour 1/5, 1/10, 1/20, il faut multiplier le titre respectivement par 20, 400, 5.000.

Ces auteurs soulignent un autre avantage de la méthode: c'est de titrer directement des milieux de culture ou des liquides souillés; les germes ne diffusant pas dans la gélose, il n'est pas indispensable de filtrer au préalable.

III. – Expérimentation personnelle

Nos recherches ont été constamment dominées par le problème pratique de l'utilisation, en bactériologie clinique, d'une préparation de Pénicillinase, facile à obtenir, active et relativement stable, destinée à détruire la pénicilline présente dans les liquides organiques adressés au Laboratoire. C'est pourquoi nous avons délaissé les problèmes biochimiques qui dépassaient nos possibilités pour rester sur le plan des techniques microbiologiques les plus courantes.

Nous rapportons les résultats sous une forme très synthétique, envisageant successivement :

— Les conditions de production;
— L'étude de l'activité;
— La stabilité des préparations obtenues.

I. CONDITIONS DE PRODUCTION

Nous avons limité notre travail à la Pénicillinase-Subtilis.

Souches. — Les préparations de l'enzyme antipénicilline ont été réalisées à partir des deux souches *B. Subtilis* « *Byline* » et *B. Subtilis* « *Ungar* » qui nous ont été très aimablement fournies par le Service de Mme Tréfouel à l'Institut Pasteur.

Les souches sont conservées sur gélose, à l'obscurité et à la température du laboratoire.

Cultures. — La culture du germe destinée à élaborer la Pénicillinase a été faite sur différents milieux nutritifs :

— Bouillon ordinaire;
— Eau peptonée « Difco »;

dans des conditions variables de *volume* et de *surface libre* :

— Ballon de 250 c.c. contenant 100 c.c. de milieu;
— Ballon de 250 c.c. contenant 40 c.c. de milieu.

Incubation. — Toutes les cultures ont été faites à la température de 37° mais avec des temps d'incubation variables :

— Quatre jours;
— Six jours;
— Huit jours.

Addition de pénicilline. — Nous basant sur des travaux de Duthie (35) montrant le caractère adapté de l'enzyme, nous avons pratiqué les cultures sur chaque milieu étudié avec et sans addition de Pénicillinase. On ajoute :

1.000 U.O. une seule fois le quatrième jour;
1.000 U.O. à deux reprises les quatrième et sixième jours.

Dans ces cas, la filtration est faite quarante-huit heures après la dernière addition de pénicilline.

Stérilisation. — Dans tous les cas, l'obtention de la préparation stérile est réalisée par filtration sur bougie Chamberland L^3 montée sur un flacon de Kitasato.

II. ETUDE DE L'ACTIVITÉ

Nous avons parfois cherché à démontrer et à titrer l'activité de nos préparations par les méthodes de diffusion en gélose type « Oxford Cup » mais pour des raisons de simplification et de routine bactériologique nous avons, pour la pratique courante, utilisé presque exclusivement la technique des dilutions en série.

Le test a été pratiqué sur des milieux variables :

— Eau peptonée « Difco »;
— Bouillon ordinaire;
— Milieu Glucose — P.S.P. de Sureau.

Le germe pénicillino-sensible adopté comme étalon pour tous nos dosages est le *Staphylococcus Aureus H. de Londres* (n° 6571 N.C.T.C.).

Nous avons recherché l'activité de nos différentes préparations :

— Sur des lots de pénicilline de marque, de pureté et de puissance différentes;
— Sur des solutions antibiotiques de concentrations variées après une durée variable de contact de la pénicilline et de la Pénicillinase.

III. STABILITÉ

Les préparations destinées à la technique courante de bactériologie clinique sont conservées en ampoules scellées de 1 c.c. à la glacière.

Celles destinées à l'étude expérimentale sont mises :

—En tubes stériles;

— En ampoules scellées,
et conservées
— A l'état pur;
— Diluées dans différents solvants,
à des température variables :
— A la glacière o°;
— A l'étuve à 37°;
— Sur la table du laboratoire, 15° environ.

Leur activité, après différents temps de conservation, est appréciée également par la méthode des dilutions en série.

CONDITIONS DE PRODUCTION

Le *tableau IV* donne les caractéristiques de préparation des différents lots de Pénicillinase que nous avons étudiées.

TABLEAU IV

Caractéristiques de production de nos différents lots de Pénicillinase

SOUCHE DE B. SUBTILIS	MILIEU DE CULTURE	INCUBATION SANS ADDITION de Pénicilline		INCUBATION AVEC ADDITION de Pénicilline	
		4 jours	6 jours	1000 U. O le 4e jour Filtration le 6e	1000 U. O le 5e et le 6e jour Filtration le 8e
« Byline »...	Bouillon ordinaire	A	C	B (1)	»
« Ungar »...	Eau peptonée « Difco »	D	H	E (2)	G (2)
« Ungar »...	Bouillon ordinaire	J	L	K (2)	M (2)

(1) Pénicilline Ayerst 146.712 exp. : 5.8.47 800 U/mg.
(2) Spécilline G 1301, exp. : déc. 1950, 1.600 U/mg.

Pour titrer l'activité antipénicilline de ces préparations nous avons utilisé la méthode des dilutions en série de la façon suivante :

A une série de tubes à hémolyse contenant chacun 1 c.c. d'une dilution de pénicilline de titre connu (1.000, 100, 10,

1, 0,1 U.O./c.c.) en solution tampon phosphatée pH 7, on ajoute dans le premier tube 1 c.c. de la préparation de Pénicillinase (pure ou diluée à 1/10, 1/100 en solution tampon) et on passe 1 c.c. en série jusqu'à l'avant-dernier tube inclus ,le dernier sert de témoin (tableau V).

TABLEAU V

Titrage de l'activité antipénicilline de la Pénicillinase : Technique des dilutions en série

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Solution de Pénicilline (1) cc.....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pénicillinase (2)...	I. — Passage en série jusqu'au 10e tube inclus.										0
Taux de Pénicillinase	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0

Après vingt-quatre heures de contact sur la table du laboratoire, on ajoute, dans chaque tube, 1 c.c. de bouillon glucosé ensemencé par le *St. Aureus H* (0,1 c.c. d'une culture en bouillon de dix-huit heures pour 10 c.c. de milieu).

Les portoirs sont placés à l'étuve à 37° et les lectures faites au bout de dix-huit, vingt-quatre, quarante-huit, soixante-douze, quatre-vingt-seize, cent vingt et cent quarante-quatre heures.

Nous groupons sur le tableau VI les résultats de tels titrages pratiqués dans les mêmes conditions sur nos différents échantillons de Pénicillinase. Nous avons tenu compte seulement du taux minimum de Pénicillinase permettant la pousse en vingt-quatre heures du germe étalon.

On peut souligner sur ce tableau comparatif les points suivants :

— Les Pénicillinases dérivant de la souche *B. Subtilis* « *Byline* » ont une activité antipénicilline certaine, assez comparable dans son intensité pour les trois échantillons étudiés, cependant il semble que le lot C soit légèrement plus actif et par conséquent qu'un séjour de six jours à

TABLEAU VI

Titrage de l'activité antipénicilline de la Pénicillinase par la technique des dilutions en série

Résultats

PENICILLINE U. O/cc (1)	TAUX MINIMUM INHIBITEUR DE PENICILLINASE (Voir Tableau IV, page 46)										
	A	B	C	D	E	G	H	J	K	L	M
1.000.....	1/64	1/64	1/64	1/4	1/4	1/2	1/2	1/128	1/64	1/312	1/16
100.....	1/160	1/160	1/160	1/10	1/10	1/4	1/4	1/320	1/160	1/640	1/80
10.....	1/640	1/640	1/1280	1/20	1/20	1/10	1/10	1/1280	1/640	1/2560	1/320
1.....	1/1280	1/1280	1/1600	1/40	1/40	1/20	1/20	1/2560	1/1280	1/5120	1/640
0,1.....	1/1600	1/1600	1/3200	1/160	1/160	1/40	1/80	1/3200	1/1600	1/6400	1/800

(1) Spécilline G 1.301, exp : déc. 1950, 1.600 U/mg.

(Le mélange Pénicilline-Pénicillinase est laissé 24 heures à 15° avant l'ensemencement par le St. Aureus H en bouillon glucosé. Lecture après 24 h. d'incubation à 37°.)

37° pour la culture du *B. Subtilis* donne de meilleurs résultats qu'une incubation moindre (lot A); l'addition de pénicilline (lot B) non seulement ne paraît pas augmenter la puissance antipénicilline mais s'opposerait peut-être à l'accroissement de l'activité obtenue par la prolongation du séjour à l'étuve.

— Les Pénicillinases dérivant de la souche *B. Subtilis* « *Ungar* » varient considérablement dans leur activité.

— Les filtrats de culture en eau peptonée (D, E, G, H) ont une activité très faible

— alors que ceux obtenus à partir de cultures en bouillon ordinaire (J, K, L, M) ont une activité considérable.

Là encore, l'addition de pénicilline ne paraît pas accroître le rendement de façon notable.

Ces résultats sont trop fragmentaires pour permettre de tirer des conclusions valables.

La souche « *Ungar* » paraît supérieure à la souche « *Byline* » en ce qui concerne la production d'une Pénicillinase extra-cellulaire; cela n'apparaît pas nettement sur ce tableau car les conditions de production ne sont pas superposables : les cultures de *B. Subtilis* « *Byline* » sont faites dans 100 c.c. de bouillon alors que celles de la souche « *Ungar* » sont faites dans 40 c.c. de milieu, le volume est plus faible et la surface du voile plus grande.

Mais nous basant sur des expériences complémentaires portant sur un nouveau lot N de Pénicillinase-Subtilis obtenu à partir de la souche « *Ungar* » dans des conditions identiques à celles de A, il nous est possible d'affirmer la supériorité de la première souche à ce point de vue.

De même, le bouillon ordinaire paraît très supérieur à l'eau peptonée « Difco » pour la production de l'enzyme. Nous avons essayé ce dernier milieu en espérant ainsi standardiser le plus possible les conditions de production et obtenir une Pénicillinase de titre constant.

Nous avons également obtenu des échantillons de Pénicillinase (P, Q, R, S) à partir de cultures en bouillon glucosé mais par suite d'une erreur, le glucose a été ajouté à la concentration de 2 %.

Nous comptons reprendre la question en suivant la technique proposée par Grumbach, Boyer et Sureau qui utilisent le bouillon glucosé à 2 ‰.

ETUDE DE L'ACTIVITE

I. Nous avons cherché à préciser l'activité de la Pénicillinase-Subtilis sur des pénicillines-sodium de qualités différentes.

Le tableau VII rend compte d'une série d'expériences pratiquées dans ce but.

Nous avons volontairement choisi pour cet exemple des concentrations antibiotiques relativement faibles (100, 75, 50, 25, 10, 5, 1 U.O./c.c.) car avec des taux plus élevés (10.000, 5.000, 1.000 U.O./cc. par exemple), nous avons vérifié les faits rapportés par Hunwicke (68) : les résultats sont considérablement faussés avec les pénicillines colorées

d'activité faible, probablement en raison de la présence d'impuretés dans les préparations.

TABLEAU VII

Action antipénicilline de la Pénicillinase :

Influence de la pureté et de la puissance de l'échantillon de pénicilline

PENICILLINE CONCENTRATION U. O/cc.	TAUX MINIMUM INHIBITEUR DE PÉNICILLINASE (1)		
	PÉNICILLINE I (2)	PÉNICILLINE II (3)	PÉNICILLINE III (4)
100.....	1/80	1/100	1/160
75.....	1/80	1/100	1/160
50.....	1/100	1/160	1/320
25.....	1/160	1/320	1/320
10.....	1/320	1/320	1/400
5.....	1/320	1/400	1/400
1.....	1/640	1/640	1/640

(1) Pénicillinase Subtilis A en ampoules conservées en glacière.
(2) Pénicilline Merk, N° 328, exp. : 1/8/47, 655 U/mg.
(3) Pénicilline Ayerst, N° 149.099, exp. : 16/12/47, 1.050 U/mg.
(4) Spécilline G N° 1301, ex. : déc. 1950, 1.600 U/mg.

Dans les conditions réalisées, les chiffres paraissent assez comparables bien que les degrés de purification des préparations varient dans des proportions importantes. L'activité antibactériostatique la plus nette est cependant démontrée à l'égard de la pénicilline G cristallisée.

TABLEAU VIII

Activité antipénicilline de la Pénicillinase éprouvée sur le staphylococcus Aureus H
Lecture après des temps d'incubation variables :
Taux minimum inhibiteur de Pénicillinase (1)

CONCENTRATION de Penicilline (2) en U O/cc.	TEMPS D'INCUBATION (3)								
	18 h.	24 h.	36 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.	144 h.	168 h.
10.000.....	1/2	1/4	1/4	1/8	1/16	1/16	1/32	1/64	1/64
5.000.....	1/5	1/10	1/10	1/20	1/20	1/40	1/40	1/80	1/80
1.000.....	1/20	1/40	1/40	1/80	1/160	1/160	1/320	1/320	1/320
500.....	1/20	1/80	1/80	1/160	1/160	1/320	1/320	1/640	1/640
100.....	1/80	1/160	1/320	1/320	1/640	1/640	1/640	1/640	1/640
50.....	1/80	1/160	1/320	1/640	1/640	1/640	1/1280	1/1280	1/1280
10.....	1/160	1/320	1/320	1/640	1/640	1/1280	1/1280	1/1280	1/1280
5.....	1/200	1/400	1/400	1/800	1/800	1/1600	1/1600	1/1600	1/3200
1.....	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/1600	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200
0,5.....	1/400	1/800	1/1600	1/1600	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200	1/3200
0,1.....	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/16000	1/16000	1/16000

(1) Pénicillinase lot C, conservée à la glacière en ampoules scellées depuis 3 mois.
(2) Spécilline G nº 1301, exp. : déc. 1950, 1600 U/mg.
(3) **St. Aureus H** ensemencé à la dilution 10^{-3} en milieu glucosé P.S.P. de Sureau.

II. L'adoption de la technique des dilutions en série avec lecture après des temps variables d'incubation du mélange ensemencé par le staphylocoque étalon en milieu nutritif présente l'avantage de mettre en évidence de la façon la plus nette le rôle notable du séjour à l'étuve.

Le tableau VIII résume la moyenne des résultats portant sur une série importante de dosages.

Il démontre de façon incontestable **qu'il n'y a aucune proportionnalité entre la quantité de pénicilline détruite en un temps donné et le taux de Pénicillinase nécessaire pour cette inactivation.**

Pour rendre ce fait encore plus apparent, nous avons fait une représentation graphique de ces phénomènes en portant en ordonnées les concentrations de pénicilline (en U.O./c.c.) suivant une progression logarithmique et en abcisse les taux de Pénicillinase (en fraction de c.c.) suivant une progression géométrique. Nous avons seulement tracé les courbes correspondant à des temps d'incubation de ving-quatre, quarante-huit, quatre-vingt-seize et cent quarante-quatre heures.

On voit que pour des valeurs élevées de la concentration antibiotique (10.000 à 500 U.O./c.c.) les courbes s'éloignent peu dans leur direction générale de la droite de la proportionnalité mais pour des valeurs moindres elle s'en écarte ensuite de façon considérable.

III. Nous avons étudié l'activité antipénicilline de la Pénicillinase en présence de *Staphylococcus Aureus H* ensemencé sur des milieux différents.

Le tableau IX représente, à titre d'exemple, les résultats d'une série de tests pratiqués sur l'eau peptonée « Difco » ajustée à pH 7 avec et sans addition de glucose à 3 % et le même milieu glucosé à 3 % ajusté à pH 8,2.

Il apparaît que l'action antipénicilline de la Pénicillinase en présence du *Staphylococcus Aureus* se produit dans chacun des trois milieux mais l'activité est plus nette en présence de glucose que dans le même milieu sans glucose. En présence du glucide, l'activité varie peu en fonction du pH. Dans les trois cas, on retrouve la variation importante du

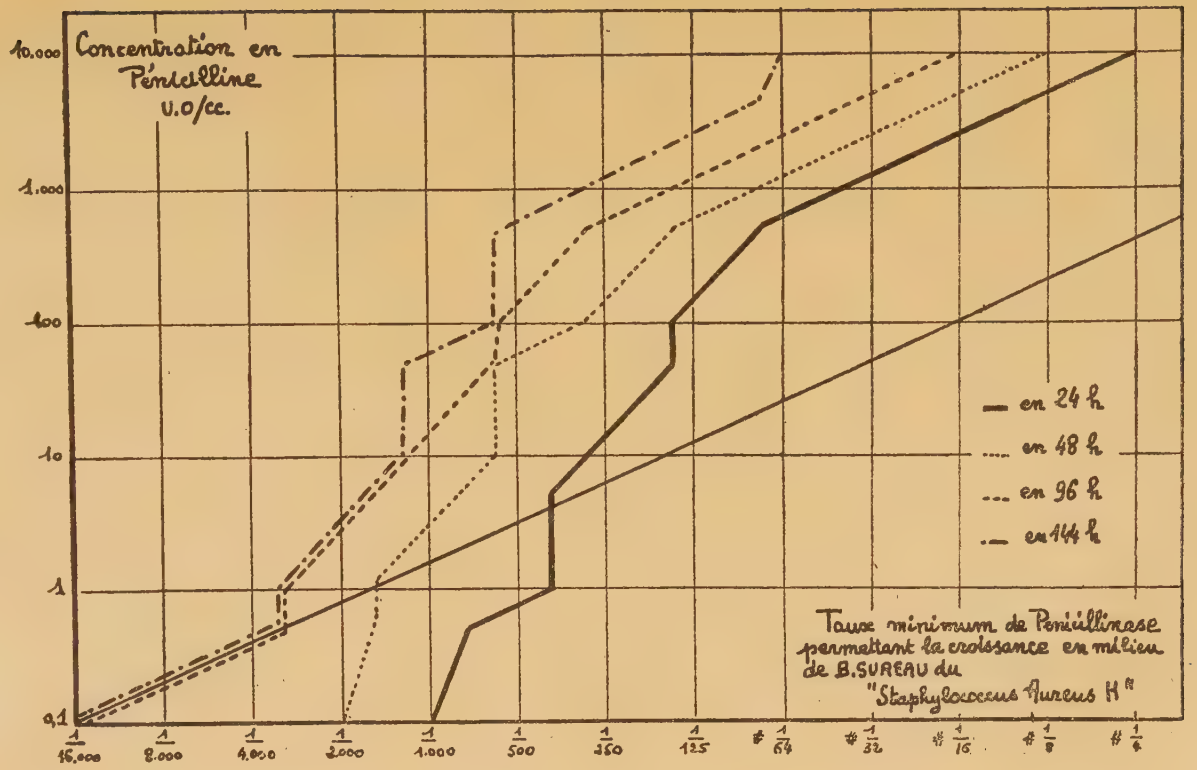
Concentration en Pénicilline U.O/cc.
10.000
1.000
100
10
1
0,1
— en 24 h
.... en 48 h
--- en 96 h
-.- en 144 h
Taux minimum de Pénicillinase permettant la croissance en milieu de B.SUREAU du "Staphylococcus Aureus H"
1/16.000
1/8.000
1/4.000
1/2000
1/1.000
1/500
1/250
1/125
1/64
1/32
1/16
1/8
1/4

TABLEAU IX

Activité antipénicilline de la Pénicillinase en présence du Staphylococcus Aureus H, ensemencé sur différents milieux

Taux minimum inhibiteur de Pénicillinase (1)

MILIEUX ENSEMENCÉS St-Aureus (3)	PENICILLINE U. O./cc	TEMPS D'INCUBATION 24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.	144 h.
Eau peptonée Difco pH7	10.000.....	1	1/4	1/8	1/8	1/16	1/16
	1.000.....	1/5	1/20	1/40	1/40	1/80	1/80
	100.....	1/20	1/40	1/40	1/80	1/160	1/320
	10.....	1/40	1/80	1/320	1/320	1/640	1/640
	1.....	1/100	1/400	1/400	1/800	1/1600	1/1600
Eau peptonée Difco glucosée 3% pH7	10.000.....	1/2	1/8	1/16	1/16	1/32	1/64
	1.000.....	1/40	1/80	1/160	1/320	1/320	1/640
	100.....	1/160	1/160	1/320	1/640	1/640	1/640
	10.....	1/320	1/640	1/640	1/1280	1/1280	1/1280
	1.....	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/3200	1/3250
Eau peptonée Difco glucosée 3% pH8,2	10.000.....	1/2	1/8	1/16	1/16	1/32	1/64
	1.000.....	1/40	1/80	1/160	1/160	1/320	1/320
	100.....	1/160	1/320	1/320	1/640	1/640	1/640
	10.....	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/1280	1/1280
	1.....	1/400	1/800	1/1600	1/1600	1/1600	1/3200

(1) Pénicillinase Subtilis, lot C, conservée 3 mois à la glacière.
(2) Spécilline G n° 1301, exp. : déc. 1950, 1600 U/mg.
(3) Ensemencement dilution 10^{-3}, culture de 18 h. en bouillon.

taux inhibiteur en fonction du moment où on pratique la lecture, notion essentielle sur laquelle nous avons déjà insisté.

CONSERVATION

Nous ne rapportons pas les détails de nos travaux tendant à préciser les conditions et les délais de conservation des préparations antipénicillines.

On peut en résumer les conclusions de la façon suivante :

1° *A l'état pur.* — En ampoules scellées ou en tubes stériles nos préparations de Pénicillinase-Subtilis se conservent sans rien perdre de leur activité plus de trois mois à 0° et à la température ordinaire; elles peuvent résister à un séjour prolongé à 37° (plus de quinze jours pour la Pénicillinase J).

Par contre, elles sont détruites par la chaleur vingt-quatre heures à 56° et le passage à l'autoclave vingt minutes à 110°.

2° *En solutions.* — Les résultats sont comparables en eau distillée, en solution physiologique de chlorure de sodium et en solution tampon phosphatée à pH 7, le passage à l'autoclave ou le séjour prolongé à 56° paraît détruire toute activité antipénicilline.

Pourtant, nous avons, sur ce point, noté à plusieurs reprises une anomalie qui nous paraît mériter d'être signalée :

Etant donné, par exemple, une série de tubes contenant du milieu glucose-P.S.P. additionné de pénicilline et ensemencé par le staphylocoque sensible, on réalise le passage en série d'une Pénicillinase traitée par la chaleur. Après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve à 37°, tous les tubes sont restés limpides et roses à l'exception de celui qui n'a pas reçu de pénicilline, devenu jaune vif et trouble, manifestant seul une croissance bactérienne.

Après quarante-huit heures d'incubation, il en est de même. Il semble donc que dans tous les tubes additionnés de Pénicillinase la croissance ait été inhibée, le staphylocoque tué par la pénicilline qui a conservé sa puissance antibiotique.

Si on ajoute alors dans chaque tube une goutte de culture de dix-huit heures en bouillon de *Staphylococcus Aureus H*, on note la croissance dans les premiers tubes mais non dans les autres, en particulier pas dans le témoin qui contient de la pénicilline et n'a pas reçu de Pénicillinase.

Ce n'est donc pas le séjour à l'étuve seul qui a inhibé l'action antibiotique; il faut bien admettre que la préparation de Pénicillinase, en apparence complètement inactivée par la chaleur, a joué un rôle dans ce phénomène.

La conservation des solutions de Pénicillinase dans les milieux bactériologiques : eau peptonée, bouillon ordinaire, bouillon glucosé, est très satisfaisante à 0°. A la température ordinaire, les résultats sont assez variables. La chaleur à 56° ou 110° semble inactiver complètement ces préparations.

Il y a donc là un inconvénient majeur pour l'utilisation pratique de ces Pénicillinases puisqu'il n'est pas possible d'en assurer la stérilisation par les moyens habituels.

Il est seulement possible de conserver la Pénicillinase pure ou diluée à la glacière et de l'ajouter au milieu nutritif stérile au moment de l'ensemencement. Il paraît incommode de préparer ces milieux à l'avance puisqu'on ne peut les stériliser et qu'il y a intérêt à les conserver à la glacière si on veut être sûr de leur activité antipénicilline.

C'est pourquoi nous nous sommes demandés, toujours en pensant à l'application au laboratoire clinique s'il ne serait pas possible d'ajouter à l'avance la Pénicillinase à la solution de citrate de soude destinée à s'opposer à la coagulation du sang prélevé en vue de pratiquer une hémoculture. Nous avons constaté que le citrate de soude est un bon vecteur pour la Pénicillinase et qu'à 0°,15 et 37° ces solutions conservaient leur activité antipénicilline. Nous avons alors été amenés à chercher l'effet du chauffage à deux reprises, à 56°, pendant deux heures, et du passage à l'autoclave vingt minutes à 110°.

Le tableau X rend compte d'une série d'expériences assez démonstratives à cet égard.

Etant donné la fréquence et l'intérêt de l'association pénicilline-sulfamides, l'addition d'acide para-amino-benzoïque est souvent utile en même temps que celle de Péni-

TABLEAU X

Stabilité de la Pénicillinase à la chaleur en présence de citrate de soude

SOLUTION A 1/10 DE PÉNICILLINASE LOT L en citrate de soude à 2 %	TAUX MINIMUM INHIBITEUR SUR 100 U. O. DE PÉNICILLINE (1) en présence de St. Aureus H en milieu glucose P.S.P. (2)					
	18 h.	24 h.	36 h.	48 h	72 h	96 h.
Conservée à 0° — 24 heures.....	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/5120	1/10240
Conservée à 0° — 20 jours.....	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/5120	1/10240
Conservée à 15° — 24 heures.....	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/5120	1/5120
Conservée à 15° — 20 jours.....	1/640	1/640	1/1280	1/2560	1/2560	1/5120
Conservée à 37° — 24 heures.....	1/640	1/1280	1/2560	1/2560	1/5120	1/5120
Chauffée à deux reprises à 56° pendant 2 heures et gardée ensuite à 0°..... 24 heures	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/5120	1/10240
..... 10 jours	1/640	1/1280	1/2560	1/2560	1/5120	1/10240
Chauffée à l'autoclave 20 minutes à 110°, conservée ensuite à 0°..... 24 heures	1/40	1/80	1/160	1/320	1/320	1/640
..... 10 jours	1/40	1/80	1/80	1/160	1/320	1/640

(1) Spécilline G, N° 1.301, déc. 1950, 1.600 U/mg.
(2) Ensemencement dilution 10^{-3}, culture 18 h. en bouillon.

cillinase au moment de l'ensemencement. Nous avons recherché, dans une nouvelle série d'expériences, le rôle possible de l'association acide P.A.B. + citrate de soude sur la Pénicillinase.

Une série d'expériences superposable à celle du tableau X est résumée sur le tableau XI.

TABLEAU XI

Stabilité de la Pénicillinase à la chaleur en présence de citrate de soude et d'acido para-amino-benzoïque

SOLUTION A 1/10 DE PÉNICILLINASE LOT L en citrate de Na+acide p.a.b. (1)	TAUX MINIMUM INHIBITEUR SUR 100 U. O. DE PÉNICILLINE en présence de St. Aureus H en milieu glucose P.S.P. (2)					
	18 h.	24 h.	36 h.	48 h.	72 h.	96 h.
Conservée à 0°.... 20 heures	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/10240	1/10240
.... 20 jours	1/1280	1/2560	1/5120	1/5120	1/10240	1/10240
Conservée à 15°... 24 heures	1/1280	1/2560	1/5120	1/5120	1/10240	1/10240
.... 20 jours	1/1280	1/1280	1/2560	1/5120	1/5120	1/5120
Conservée à 37°... 24 heures	1/1280	1/2560	1/5120	1/5120	1/10240	1/10240
Chauffée à deux reprises à 56° pendant 2 heures et conservée ensuite à 0° ... 24 heures	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/5120	1/10240
... 10 jours	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/5120	1/10240
Chauffée à l'autoclave 20 minutes à 110° et conservée ensuite à 0°... 24 heures	1/40	1/80	1/160	1/320	1/320	1/640
... 10 jours	1/40	1/80	1/80	1/160	1/320	1/640

(1) Mélange :
Citrate de soude à 2 %..... 9 cc.
Acide para-amino-benzoïque à 1/1.000..... 1 cc.
(2) Ensemencement dilution 10^{-3}, culture 18 h. en bouillon.

Devant ces deux tableaux X et XI, les résultats assez comparables paraissent pleinement convaincants. En réalité, bien que les taux ici rapportés représentent la moyenne de

trois dosages similaires, nous ne pensons pas qu'il soit possible d'affirmer qu'en solution de citrate de soude à 2 % la Pénicillinase Subtilis supporte toujours le chauffage dans les mêmes conditions. Le chauffage à 56°, à deux reprises pendant deux heures n'entraînerait qu'une perte relativement faible de puissance et le passage à l'autoclave vingt minutes à 110° provoquant une diminution notable laisserait encore persister une certaine activité antipénicilline.

Etant donné l'importance pratique de telles données, ces essais ont été répétés dans des conditions différentes; il semble que les résultats varient considérablement suivant les lots (les Pénicillinases J et C ont montré une perte d'activité beaucoup plus considérable). Il nous paraît encore trop tôt pour conclure.

En attendant des précisions complémentaires, il est donc prudent de n'utiliser que des préparations d'activité contrôlée (dans des conditions rigoureuses de concentration antibiotique et de temps d'incubation avant la lecture) et conservées à la glacière en ampoules scellées. Il est possible de laisser les Pénicillinases à la température ordinaire mais il peut être prudent de noter la date de production afin d'en garantir la validité dans l'ignorance où nous sommes encore de la durée exacte de conservation, sans perte d'activité.

ACTION DE LA PENICILLINASE-SUBTILIS SUR LA POUSSE MICROBIENNE

Devant les belles découvertes de Ramon sur les propriétés antidotiques et antibiotiques de la « *Subtiline* », nous nous sommes demandés si l'addition de filtrat de culture de B. Subtilis à un milieu de culture ensemencé par un germe parfois très fragile ne pouvait avoir un effet empêchant sur la pousse microbienne.

Pour préciser ce point important, nous avons, par la technique des dilutions en série, recherché l'action antibiotique possible de nos préparations. Décrivons un de ces tests à titre d'exemple (Tableau XII) :

Les résultats se sont montrés sensiblement comparables :

— Avec d'autres lots de Pénicillinase (A, D, J, L);

TABLEAU XII

Action de la Pénicillinase sur la croissance du Staphylococcus Aureus H en eau peptonée Difco

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Eau peptonée Difco ensemencée St. Aureus H...	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pénicillinase Subtilis (C pure). . ..	1 dilution en série.....										0
Taux de Pénicillinase...	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
16 h.....	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24 h.....	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
48 h.....	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
72 h.....	+ (1)	+ (1)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(1) Les frottis montrent des corps microbiens peu nombreux dont certains sont irréguliers ou abîmés. Ces cultures repiquées sur milieu ordinaire ont présenté une croissance normale.

— Avec des milieux différents (bouillon glucosé, milieu Glucose-P.S.P.);

— Avec des germes pathogènes récemment isolés d'un malade (*Streptococcus Proteiformis* M. 317, *Staphylococcus Aureus* C. 981).

Avec des préparations diluées, la pousse est complète et identique dans tous les tubes. Les frottis, après coloration de Gram, ne montrent aucune modification morphologique.)

Dans ces conditions, **il ne semble pas que l'on ait à redouter de l'addition en quantité très minime de Pénicillinase subtilis au milieu ensemencé une action antibiotique ou empêchante quelconque.**

DEUXIÈME PARTIE

LES APPLICATIONS PRATIQUES DE LA PÉNICILLINASE

Laboratoire clinique

I. — EXAMENS BACTERIOLOGIQUES AU COURS DE LA PENICILLINOTHERAPIE

EXPÉRIMENTATION SUR L'ANIMAL

La possibilité d'utiliser la Pénicillinase pour détruire la pénicilline présente, dans les échantillons provenant de sujets soumis à la pénicillinothérapie, a été démontrée de façon indiscutable dans une série d'expériences pratiquées *sur l'animal* par Housewright et Henry (67).

Ces auteurs ont inoculé quatorze lapins par l'injection sous-cutanée de 1.000 spores de *Bacillus Anthracis*. Au bout de quarante-huit heures, les animaux reçoivent, toutes les deux heures, pendant douze heures, une injection intraveineuse de 1.500 à 4.000 U.O. de pénicilline. Des prélèvements de sang sont pratiqués quinze minutes après la première injection de l'antibiotique puis toutes les heures pendant huit heures. 1 c.c. de chaque échantillon est mélangé à 0,1 c.c. de Pénicillinase puis étalé sur une boîte de Petri contenant de la gélose au sang. Le centimètre cube restant est ensemencé sur un milieu identique mais sans addition préalable de Pénicillinase.

Grâce à l'utilisation du principe antipénicilline, on retrouve de très nombreux germes dans l'échantillon prélevé

quinze minutes après la première injection. Des cultures de plus en plus pauvres sont obtenues pendant les six premières heures, mais à partir de la huitième heure tous les ensemencements restent stériles. On ne note aucune croissance à partir des échantillons étalés directement sans contact préalable avec le principe antipénicilline.

L'incorporation de Pénicillinase à la gélose au sang fondue et refroidie aux environs de 45° donne les mêmes résultats que le mélange au sang.

EN CLINIQUE HUMAINE

En réalité, les premiers résultats de l'utilisation de la Pénicillinase en bactériologie clinique *chez l'homme* soumis à la pénicillinothérapie ont été rapportés bien avant l'expérimentation de Housewright et Henry sur l'animal.

Harper (56) publie en 1943 ses premières tentatives. Il utilise sa poudre de *B. Para-Coli* desséchés pour détruire la pénicilline présente dans les frottis des plaies de guerre traitées par des applications locales de pénicilline.

Chez ses seize malades, cet auteur obtient, avant l'instauration de la pénicillinothérapie, seize cultures positives. Après l'administration locale de l'antibiotique, l'ensemencement sur milieu ordinaire ne donne qu'une culture positive — il s'agit précisément d'un B. Para-Colon pénicillinorésistant —; par contre, sur milieu additionné de Pénicillinase on constate seize cultures positives.

Cet auteur pratique avec succès :

— Soit l'incorporation de la Pénicillinase à la gélose fondue;
— Soit l'addition à la surface du milieu au moment de l'ensemencement.

Devant ces résultats brillants, Harper envisage l'utilisation de la Pénicillinase pour la pratique des hémocultures chez les malades soumis à la pénicillinothérapie et du test de stérilité de la pénicilline.

La plus importante statistique d'ensemble que nous ayons pu consulter sur les résultats de l'utilisation de la Pénicillinase pour l'examen bactériologique des produits

provenant de sujets soumis à la pénicillinothérapie est celle rapportée par Dowling et Hirsh (33).

Ces auteurs analysent les résultats obtenus chez vingt-six malades pour lesquels les cultures ont été positives avant le traitement pénicilliné. Sur 186 examens pratiqués au cours du traitement :

— Les résultats obtenus avec la Pénicillinase confirment ceux donnés par les méthodes usuelles dans 149 cas (soit 80 %) :

  — 19 cultures sont positives et 130 négatives dans les deux cas.

— Dans 36 cas (soit 20 %), la croissance est pauvre ou nulle sur les milieux sans Pénicillinase tandis que les germes poussent bien dans les cultures parallèles contenant de la Pénicillinase :

  — Dans 14 cas, la culture est importante dans le milieu avec Pénicillinase et nulle dans l'autre;

  — Dans 22 cas, la croissance est rapide et abondante dans le milieu avec Pénicillinase et gênée en l'absence du principe antipénicilline.

  Cette « gêne » de la croissance par la pénicilline se manifeste de deux façons :

  — D'abord par un ralentissement des cultures tel que les germes ne sont pas décelables avant quarante-huit à soixante-douze heures au lieu des vingt-quatre heures suffisantes avant l'administration de pénicilline.

  — Ensuite par le fait que les germes poussent mal en milieu liquide et ne poussent pas sur gélose au sang.

— Dans un cas, la culture est négative dans les milieux avec Pénicillinase et positive, quoique faible, dans le milieu ordinaire.

Si on rapporte ces résultats au nombre de malades et non à celui des prélèvements, l'intérêt de la Pénicillinase est encore plus manifeste

— Sur ces vingt-six malades, chez quatorze d'entre eux (54 %), les résultats avec et sans Pénicillinase sont identiques.

— Chez huit malades (31 %), une ou plusieurs cultures

sont positives avec Pénicillinase tandis que les cultures faites en même temps sur milieu ordinaire sont négatives.

— Chez quatre sujets (15 %), les prélèvements donnent une culture riche dans le milieu avec Pénicillinase tandis que celle faite en même temps sans Pénicillinase pousse mal ou très peu.

Donc, chez 46 % des malades examinés, la présence de Pénicillinase dans le milieu a donné des renseignements qui n'auraient pas été obtenus ou qui auraient été lents ou douteux avec la culture sans Pénicillinase.

Il est intéressant d'analyser en détail quelques-uns des résultats rapportés par ces auteurs :

1° Au cours de trois endocardites à *Streptococcus Viridans* et d'une septicémie à *Staphylococcus Aureus* consécutive à une intervention pour greffe vertébrale, les auteurs ont pratiqué des hémocultures à intervalles très rapprochés après le début du traitement par la pénicilline : toutes les heures, pendant six heures, puis au bout de douze, vingt-quatre, trente-six, quarante-huit, soixante et soixante-douze heures. Chaque échantillon est ensemencé comparativement sur bouillon de veau et sur le même milieu additionné de Pénicillinase.

Dans les trois endocardites, les hémocultures en milieu ordinaire sont négatives à partir de la quatrième, neuvième et douzième heure après le début du traitement; en présence de Pénicillinase, les premières stériles le sont respectivement après cinq, neuf et cinquante-quatre heures.

Dans la septicémie à staphylocoques, la croissance en milieu ordinaire est gênée dès la première heure et arrêtée à la sixième heure après le début du traitement alors qu'avec le principe antipénicilline les délais correspondants sont rapportés respectivement à quatre et quatre-vingt-seize heures.

Il paraît donc évident que *lorsque la Pénicilline agit sur le germe en cause le médicament stérilise le sang circulant en quelques heures ou quelques jours et que le moment où le sang est stérilisé ne peut être connu avec précision sans l'utilisation de la Pénicillinase.*

2° Dans deux cas de pleurésies purulentes pneumococciques, les cultures du liquide pleural négatives en milieu ordinaire sont positives en présence de Pénicillinase avec des prélèvements datant de vingt-quatre à soixante-douze heures après le début du traitement.

3° Dans deux cas de méningite à pneumocoques, les cultures de liquide céphalo-rachidien, sur milieu avec Pénicillinase, sont positives deux ou trois jours après le début du traitement; elles sont négatives sur milieu ordinaire.

Les auteurs concluent :

La Pénicillinase peut être employée pour l'inactivation de la pénicilline dans les milieux de culture; cette méthode sert souvent à obtenir une culture positive du sang ou de tout autre liquide organique chez un malade en traitement pénicilliné tandis que les cultures faites en même temps sans Pénicillinase ne montrent pas de croissance microbienne ou une croissance ralentie ou gênée.

Dans certains cas, le germe ne pousse pas, que l'on utilise ou non la Pénicillinase. Ceci est probablement dû à la rapidité avec laquelle la Pénicilline à doses thérapeutiques stérilise le sang et les tissus des germes sensibles à son action.

Adoptant une Pénicillinase titrée suivant la méthode de Mac Quarrie et Liebmann (86), les auteurs recommandent d'ajouter 1 U. de Pénicillinase par centimètre cube de sang ou de liquide organique ensemencé, sauf pour l'urine où le taux de Pénicillinase doit être porté à 100 U. par centimètre cube.

RESULTATS PERSONNELS

Nous rapportons en détail quelques-uns des résultats des examens bactériologiques effectués en collaboraiton avec Mme le Docteur Enjalbert au Laboratoire de Bactériologie de la Faculté sur des prélèvements provenant de sujets soumis à la pénicillinothérapie dans les hôpitaux de Toulouse. Nous remercions MM. les Chefs de service d'avoir bien voulu nous confier ces examens et nous autoriser à prendre connaissance des observations de leurs malades.

OBSERVATION I

B..., Audry, Chirurgie-Sud (Professeur Ducuing).

Phlegmon du cou.

Examen N° 169 du 22/1/47 : Pus prélevé par ponction avant toute pénicillinothérapie.

Ex. direct : Pus épais, très nombreux polynucléaires, cocci Gram + en chaînettes longues intra et extra-cellulaires.

Cultures : B. Ord. : *Streptocoque* en 24 h.

Examen N° 179 du 25/1/47 : Pus prélevé par ponction après pénicillinothérapie 500.000 U.O. — I.M. à raison de 30.000 U.O. toutes les 3 heures, 50.000 U.O. injection locale le 22/1/47.

Ex. direct : Pus à polynucléaires et mononucléaires très altérés, quelques cocci en chaînettes Gram + tous intra-cellulaires.

Cultures : B. glucosé : *Stérile* en 48 h.
B. glucosé + Pénicillinase (1 c.c. lot A).
Streptocoque en 24 h.
Culture abondante, homogène, trouble uniforme en 24 h., puis dépôt en 48 h., chaînettes plus longues, plus sinueuses, cocci « soufflés ».

Culture possible seulement en présence de Pénicillinase.

OBSERVATION II

P..., C..., Condat, Médecine infantile (Professeur Sorel).

Pleurésie purulente chez un nourrisson.

Examen N° 393 du 7/3/47 : Liquide pleural, ponction après pénicillinothérapie : 160.000 U.O. I.M. depuis 24 h., à raison de 20.000 toutes les 3 heures, 20.000 U.O. intrapleurales le 6/3/47.

Ex. direct : Pus épais, jaune verdâtre. Polynucléaires très altérés, très rares cocci Gram +.

Cultures : B. ord., gélose ord. : *stériles* en 8 jours.
B. ord. + Pénicillinase (1 goutte Lot A), après 8 jours d'étuve à 37° :

Culture de diplocoques lancéolés Gram + à morphologie de *pneumocoques* qui ne repoussent pas au repiquage.

Culture maigre et très tardive en présence de Pénicillinase seulement.

OBSERVATION III

B..., Bouillaud, Médecine-Nord (Professeur Roques).

Syndrome septicémique.

Examen N° 384 du 8/3/47 : Hémoculture sous pénicillinothérapie : 100.000 U.O. toutes les 3 heures, depuis le 1/7/47.

Cultures : B. glucosé : *stérile.*
« Brain Heart Infusion » = cocci Gram + diplocoques en grains de café altérés;
Repiquage : *staphylocoque tétragène* blanc.

Pénicillino-sensibilité 0,01-0,02. U.O./c.c.
(Spécilline « G » 1301, déc. 1950. Eau peptonée Difco 24 h., inoculat 10^{-3}).
B. glucosé « B. H. I. » + Pénicillinase (1 goutte lot A).
Tétragène + subtilis (souillure de la Pénicillinase).

Cultures comparables avec et sans Pénicillinase.

OBSERVATION IV

T..., Condat, Médecine infantile (Professeur Sorel).

Méningite aiguë chez un nourrisson.

Examen N° 452 du 18/3/47.

1° L.C.R. — P.L. du 18 à 12 h. avant pénicillinothérapie.
Ex. direct : Liquide trouble : polynucléaires altérés, quelques monocytes, pas de germes visibles.
Cultures : Bouillon T, gélose : *streptocoque* typique.

2° L.C.R. — P.L. du 18 à 17 h. après pénicillinothérapie : 40.000 I.M. à raison de 20.000 à 12 h. et à 15 h.; 20.000 U. O. I.R. à 12 h.

Ex. direct : Liquide jaune trouble, polynucléaires, monocytes, pas de germes visibles.

Cultures : Bouillon T = *stérile* en 48 h.
Bouillon T + Pénicillinase (1 goutte lot A) en 48 h. : *streptocoque.*

Pénicillino-sensibilité 0,01-0,02. U.O./c.c.
(Pénicilline Ayerst N° 146.712, 1.400 U/mg test en bouillon T, inoculat 10—3, lecture après 24 h.).

Culture possible en présence de Pénicillinase seulement.

Examen N° 468 : L.C.R. — P.L. du 20/3/47, 17 h., après pénicillinothérapie :

20.000 U.O. I.M. toutes les 3 heures.
20.000 U.O. I.R. tous les jours.

Ex. direct : Polynucléaires peu altérés, rares lymphocytes, pas de germes visibles.

Cultures : Bouillon T : culture peu abondante.
Bouillon ord. : culture peu abondante.
Bouillon T + Pénicillinase (11 gouttes dilution 1/250 lot A).
Bouillon ord. + Pénicillinase (11 gouttes dilution 1/250 lot A).
Culture abondante de diplocoques Gram positifs et de coccobacilles Gram négatifs.
Identification : *Streptocoque.*
Colibacille.

Culture plus abondante en présence de Pénicillinase.

Examen N° 474 : L.C.R. — P.L. du 21/3/47, 12 h.

Ex. direct : Pénicillinothérapie mêmes doses; sulfamidothérapie locale et générale.
Polynucléaires très picnotiques, pas de germes visibles.

Cultures : Bouillon T ± Pénicillinase (1 goutte lot A).
Streptocoque et *colibacille* en 24 h.

Examen N° 475 : L.C.R. — A.O. du 21/3/47, 12 h.

Ex. direct : Polynucléaires, rares monocytes, pas de germes visibles.

Cultures : Bouillon T ± Pénicillinase (1 goutte lot A).
Streptocoque et *colibacille* en 24 h.

Examen N° 476 : L.C.R. — P.L. du 21/3/47, 17 h.

Ex. direct : Polynucléaires, pas de germes visibles.

Cultures : Bouillon T ± Pénicillinase (1 goutte lot A). *Streptocoque* et *colibacille* en 24 h.

Examen N° 481 : L.C.R. — P.L. du 22/3/47, 12 h.

Cultures : Bouillon T ± Pénicillinase : *Streptocoque* et *colibacille* en 24 h.

Examen N° 483 : L.C.R. — P.L. du 24/3/47, 12 h.

Cultures : Bouillon T ± Pénicillinase : *Streptocoque* et *colibacille* en 24 h.

Examen N° 484 : L.C.R. — P. L. du 24/3/47, 17 h.

Ex. direct : Polynucléaires altérés, quelques monocytes, pas de germes visibles.

Cultures : Bouillon T ± Pénicillinase : *stériles.*

Examen N° 501 : L.C.R. — P.L. du 28/3/47, 12 h.

Ex. direct : Sang et polynucléaires, pas de germes visibles.

Cultures : Bouillon T ± Pénicillinase : *stériles.*

Cultures identiques avec et sans Pénicillinase.

OBSERVATION V

C..., A..., Condat, Médecine infantile (Professeur Sorel).

Méningite aiguë chez un nourrisson.

Examen N° 783 du 15/5/47 : L.C.R. — P.L. du 14/5/47, 18 h. avant tout traitement.

Ex. direct : Très nombreux polynucléaires altérés, très nombreux diplocoques, lancéolés, Gram +, encapsulés.

Cultures : B. T., B. ascite : *pneumocoque.*

Examen N° 784 du 15/5/47 : L.C.R. — P.L. du 15/5/47, 11 h., après pénicillinothérapie locale et générale.

50.000 U.O. I.M., à raison de 10.000 U.O. toutes les 3 heures et 20.000 U.O. I.R. le 14/5/47, à 18 heures.

Ex. direct : Polynucléaires altérés, quelques mononucléaires, très nombreux diplocoques encapsulés, allongés, prenant le Gram irrégulièrement.

Cultures : B. T. et B. ascite : *stériles.*

B. T. + Pénicillinase (1 goutte lot C) :

Culture pauvre 24 h. cocci Gram + . *Pneumocoque.*

Pénicillino-sensibilité : 0,08 U.O./c.c. (Pénicilline Ayerst 146.712, 1.400 U/mg. Test en bouillon T, inoculat 10^{-3}, lecture après 24 h. à 37°).

Culture possible seulement en présence de Pénicillinase.

OBSERVATION VI

P..., G..., Dieulafoy, Médecine Sud (Professeur Tapie).

Pyopneumothorax.

Examen du 30/5/47 : Pus pleural. Ponction du 30/5/47 avant toute thérapeutique.

Ex. direct : Nombreux polynucléaires, quelques lymphocytes, très nombreux germes; cocci Gram + isolés et en diplocoques, certains encapsulés.

Cultures : Bouillon ord., bouillon T, gélose : *pneumocoque.*

Examen N° 861 du 31/5/47 : Pus pleural. Ponction du 31/5/47, injection intrapleurale de 100.000 U.O. de pénicilline 24 h. auparavant. Pas de pénicillinothérapie par voie générale.

Ex. direct : Très nombreux polynucléaires, quelques mononucléaires, très rares cocci Gram + .

Cultures : Bouillon ordinaire, bouillon T, gélose : culture pauvre de cocci G + , diplocoques et chaînettes courtes. Identification : *pneumocoque.*

Bouillon T + Pénicillinase : *stérile* (1 gtte lot C).

Culture pauvre mais possible en milieu ordinaire, stérile en présence de Pénicillinase.

Examen N° 875 du 2/6/47 : Pus pleural. Ponction du 2/6/47, injection intrapleurale de 200.000 U.O. de pénicilline

48 h. auparavant. Pas de pénicillinothérapie par voie générale.

Ex. direct : Polynucléaires et mononucléaires, pas de germes visibles.

Cultures : Bouillon T ± Pénicillinase : *stériles.*

Cultures stériles avec et sans Pénicillinase.

OBSERVATION VII

Suppuration extra-pleurale.

Mlle C..., F..., Centre de Phtisiologie (Docteur Baudot).

Examen N° 977 du 24/6/47 : Pus prélevé par ponction sous pénicillinothérapie. I.M. 160.000 U.O. depuis le 22/6/47, à raison de 20.000 unités toutes les 3 heures. 100.000 en injection locale le 23/6/47 à 12 h. et 18 h. Sulfamidothérapie : sulfamethyldiazine, 6 gr. par jour.

Ex. direct : Très nombreux polynucléaires altérés, nombreux cocci Gram + isolés, en diplocoques et en grappes, de taille irrégulière, intra et extra-cellulaires.

Cultures : Gélose, bouillon T : culture peu abondante.
B. T. + Pénicillinase (11 gouttes lot C), culture plus abondante :
B. T. + Pénicillinase (11 gouttes lot C) + acide P.A.B. (11 gouttes solution à 1/100), culture très abondante :

Staphylocoque doré.

Pénicillino-sensibilité : 12,5 U.O./c.c. (Pénicilline Ayerst 146.712, 1.400 U/mg. Test en bouillon glucosé, ensemencement 10^{-3}, lecture après 24 h. à 37°).

Culture plus abondante en présence de Pénicillinase et d'acide P.A.B. qu'avec Pénicillinase seule ou qu'en milieu ordinaire.

Examen N° 981 : Même thérapeutique.

Ex. direct : Très nombreux polynucléaires, nombreux cocci Gram +, taille irrégulière en grappes.

Cultures : Bouillon ord. : +
Bouillon + Pénicillinase (11 gouttes lot C) : + +
Bouillon + Pénicillinase + acide P.A.B. : + + +
Staphylocoque doré.

Examen N° 991 : Même thérapeutique.

Ex. direct : Polynucléaires et très nombreux cocci Gram + en grappes.

Cultures : B. T. ± Pénicillinase : *staphylocoque doré* +.

Examen N° 1003 du 30/6/47 : Même thérapeutique.

Ex. direct : Nombreux polynucléaires, quelques monocytes, nombreux cocci Gram +.

Cultures : B. glucosé : +.
B. glucosé + Pénicillinase : *staphyl. doré* + +.

Examen N° 1010 du 1/7/47 : Même thérapeutique.

Ex. direct : Polynucléaires. Nombreux cocci Gram + en grappes.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase : *staphylocoque doré* +.

Examen N° 1011 : Après lavage et injections intrapleurales de tyrothricine et sulfonylthiourée.

Ex. direct : Polynucléaires très altérés, nombreux débris cellulaires, moins nombreux cocci Gram +.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase : *staphyl. doré* +.
Pénicillino-sensibilité : 10 U.O./c.c. (spécilline G).

Examen N° 1021 du 3/7/47 : même thérapeutique.

Ex. direct : Polynucléaires très altérés, nombreux débris cellulaires, cocci Gram + moins nombreux.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase: *staphyl. doré* +.

Examen N° 1042 du 5/7/47 : Après drainage le 4/7/47 et lavages.

Ex. direct : Polynucléaires, peu nombreux cocci tous intracellulaires.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase : *staphyl. doré* +.

Examen N° 1060 du 15/7/47, après pénicilline et sulfonylthiourée intrapleurales.

Ex. direct : Polynucléaires, monocytes, peu nombreux cocci, tous intracellulaires.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase : *staphyl. doré* +.
Pénicillino-sensibilité : 10 U.O./c.c. (Spécilline G).

Examen N° 1061 du 15/7/47 : Ponction d'une poche superficielle, même thérapeutique.

Ex. direct : Eléments cellulaires très altérés, polynucléaires picnotiques, cocci rares intracellulaires.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase : *staphyl. doré.* +.

Examen N° 1091 du 21/7/47 : Après lavage à la tyrothricine.

Ex. direct : Polynucléaires assez peu altérés, quelques monocytes, pas de germes visibles.

Cultures : G. glucosé ± Pénicillinase : *staphyl. doré* +.

Examen N° 1108 du 23/7/47 : Même thérapeutique.

Ex. direct : Polynucléaires assez peu altérés, pas de germes visibles, lymphocytes 15 %.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase : *staphyl. doré* +.

Examen N° 1119 du 24/7/47 : Même thérapeutique.

Ex. direct : Nombreux polynucléaires peu altérés.
Quelques rares lymphocytes et monocytes, pas de germes visibles à l'examen direct.

Cultures : B. T. ± Pénicillinase : *stérile.*

Examen N° 1129 du 26/7/47 : Après pénicilline et sulfonylthiourée intrapleurales.

Ex. direct : Pus plus clair, moins épais, polynucléaires légèrement picnotiques, monocytes 10 %, pas de germes visibles.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase : *staphyl. doré* +.

Examen N° 1136 du 28/7/47 : Même thérapeutique.

Ex. direct : Polynucléaires peu altérés, quelques monocytes, pas de germes visibles.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase : *staphyl. doré* +.

Examen N° 1142 du 30/7/47 : Même thérapeutique, liquide de lavage de la poche supérieure.

Ex. direct : Rares éléments cellulaires altérés, pas de germes visibles.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase : *stérile.*

Examen N° 1143 du 30/7/47 : Même thérapeutique, poche inférieure.

Ex. direct : Polynucléaires légèrement altérés, 8 % monocytes, pas de germes visibles.

Cultures : Gélose ± Pénicillinase : quelques colonies de *staphylocoque doré.*

Examen N° 1152 du 1/8/47 : Même thérapeutique.

Ex. direct : Polynucléaires picnotiques, 10-12 %, monocytes, peu de germes visibles.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase; *staphyl. doré* +.

Examen N° 1167 du 4/8/47 : Même thérapeutique.

Ex. direct : Polynucléaires picnotiques 80%, lymphocytes 10%, monocytes 10%, quelques rares germes visibles.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase : *staphyl. doré* +. Sur gélose culture pauvre, staphylocoque pigment altéré.

Pénicillino-sensibilité : 10 U. O./c.c. (Spécilline G).

Cultures identiques avec et sans Pénicillinase.

OBSERVATION VIII

M^me^ P..., Laënnec, Centre de Phtisiologie (Docteur Baudot).

Suppuration extra-pleurale.

Examen N° 1032 du 8/7/47 : Ponction du 8/7/47 après pénicillinothérapie locale. 400.000 U.O. au moment de l'intervention, le 5/7/47.

Ex. direct : Très nombreux polynucléaires, nombreux cocci Gram + isolés et en grappes.

Cultures : B. ord. : *stérile.*
B. ord. + Pénicillinase (1 goutte lot C) : *staphylocoque doré.*

Pénicillino-sensibilité : 0,08 U.O./c.c. (Spécilline G N° 1230. Exp. : oct. 1950 1.600 U/mg. Bouillon ordinaire, ensemencement 10^{-3}. Lecture après 24 h. à 37°.)

Culture possible seulement en présence de Pénicillinase.

OBSERVATION IX

M..., Saint-Jean, Médecine Sud (Professeur Tapie).

Phlébite avec poussées emboliques.

Examen N° 261 du 27/11/47 : Hémoculture le 27/11/47, à 11 h. Pénicilline 30.000 U.O. I.M. toutes les 3 heures depuis le 26. Total : 210.000 U.O.

Cultures : B. glucosé : *stérile* en 10 jours.
B. glucosé + Pénicillinase (1 goutte lot C) : en 6 jours *streptocoque.*

Culture possible mais très retardée en présence de Pénicillinase.

OBSERVATION X

T..., B..., Vaquez, Médecine Sud (Professeur Tapie).

Pleurésie purulente.

Examen du 9/1/48 : Liquide pleural. — Ponction du 9/1/47 avant tout traitement.

Ex. direct : Liquide chyliforme.
Très nombreux polynucléaires altérés, très nombreux cocci Gram + en chaînettes de 3 à 8 éléments.

Cultures : Bouillon ordinaire : *streptocoque.*

Examen du 12/1/48 : Pus pleural. — Ponction du 12/1/48 après 800.000 U.O. par 24 h. depuis 3 jours et 40.000 U.O. intra-pleurales le 9 et le 10.

Ex. direct : Liquide purulent. Polynucléaires très altérés.
Cocci en chaînettes de taille inégale, les uns ovalaires très volumineux, les autres plus petits prenant irrégulièrement la coloration de Gram.

Cultures : Bouillon ordinaire : *stérile.*
Bouillon ordinaire + 1 goutte Pénicillinase Subtilis lot J : *Streptococcus Conglomeratus.*
Bouillon ordinaire + 11 gouttes de la même Pénicillinase : *stérile.*

Donc :

Culture possible seulement en présence de Pénicillinase mais stérile avec une concentration de Pénicillinase plus élevée.

OBSERVATION XI

M..., Chirurgie infantile (Professeur Virenque).

Ostéomyélite.

Examen N° 44 du 10/1/48 : Pus de ponction du 10/1/48.
Pénicillinothérapie 30.000 U.O. I.M. toutes les 3 heures.
Sulfamidothérapie : sulfathiazol, 6 gr. par 24 heures.

Ex. direct : Polynucléaires très altérés, pas de germes visibles.

Cultures : B. glucosé, gélose ord. : culture pauvre.
B. glucosé + Pénicillinase (Pénicillinase Subtilis, lot J, dilution à 1/10 en citrate Na + Ac. p.a.b. 1/1.000 = 11 gouttes).
Culture plus abondante de *staphylocoque doré*, dont le pigment est altéré.

Pénicillino-sensibilité = 0,01 U.O./c.c. (Spécilline G 1301, déc. 1950, 1.600 U/mg. milieu glucose P.S.P. 24 h. inoculat 10^{-3}).

Culture plus abondante en présence de Pénicillinase.

OBSERVATION XII

S..., Clinique O.R.L. (Professeur Calvet).

Mastoïdite.

Examen N° 88 du 21/1/48 : *Pus après pénicillinothérapie.*

Ex. direct : Pus à polynucléaires altérés et très nombreux cocci Gram + très altérés, formes géantes, cocci abîmés.

Cultures : B. ord. : Culture abondante.
B. ord. + 1 goutte de Pénicillinase Subtilis, lot J : culture abondante.
Bouillon ordinaire + 11 gouttes de Pénicillinase

Subtilis, lot J : culture abondante.

Staphylocoque doré.

Pénicillino-sensibilité : 2,5 U.O./c.c. Spéciline G N° 1301, exp./déc. 1950, 1.600 U/mg.

Cultures comparables avec et sans Pénicillinase.

OBSERVATION XIII

M..., B..., Dieulafoy, Médecine Sud (Professeur Tapie).

Septicopyohémie à localisations vésiculaire, pleuropulmonaire et rachidienne.

Examen N° 163 du 3/2/48 : Hémoculture après 400.000 U.O. par jour, à raison de 50.000 U.O. I.M. toutes les 3 heures depuis 3 jours.

B. glucosé aéro-anaérobie, « *Brain Heart Infusion* » Difco : stériles pendant 10 jours.

« *Brain Heart Infusion* » + Pénicillinase (1 goutte lot C) en 6 jours à 37°, rares chaînettes contenant des cocci allongés abimés, Gram +, ne poussant pas en eau peptonée, ne donnant pas le phénomène de Neufeld, ne noircissant pas l'esculine : *Streptocoque.*

Culture tardive mais possible seulement en présence de Pénicillinase.

OBSERVATION XIV

Mme L..., Rispal, Médecine Nord (Professeur Roques).

Endocardite infectieuse subaiguë.

Examen N° 209 du 10/2/48 : Hémoculture à l'entrée avant toute thérapeutique, mais le malade a reçu de la pénicilline à domicile par voie I.M.

Cultures : Bouillon ord., bouillon T, bouillon glucosé aéro-anaérobie : *stériles.*

B. ord. + Pénicillinase (1 goutte de Pénicillinase Subtilis L) : *stérile.*

B. T. + Pénicillinase (id.), colonies séparées de cocci à grains ovalaires en longues chaînettes

prenant le Gram irrégulièrement, ne noircissant pas l'esculine, mais poussant bien sur gélose : *streptocoque.*

B. glucosé + aéro-anaérobie + Pénicillinase (id.) : colonies séparées en anaérobiose : *streptocoque.*

Culture possible seulement en présence de Pénicillinase.

OBSERVATION XV

M^me^ S..., Clinique d'accouchement (Professeur Garipuy).

Infection puerpérale

Examen N° 244 du 13/2/48 : Hémoculture sous pénicillinothérapie I.M.

Cultures : Bouillon ord. : *stérile.*

B. glucosé aéro-anaérobie : *stérile.*

B. ord. + Pénicillinase (1 goutte de Pénicillinase Subtilis L) : *stérile.*

B. glucosé aéro-anaérobie + Pénicillinase (id.).

Culture très abondante de cocci en longues chaînettes prenant le Gram irrégulièrement. *Streptocoque.*

Culture possible seulement en présence de Pénicillinase.

OBSERVATION XVI

M..., V..., Saint-Jean, Médecine Sud (Professeur Tapie).

Syndrome infectieux d'allure rhumatismale.

Examen N° 247 du 14/2/48 : Hémoculture après Pénicillinothérapie I.M., 1.500.000 U.O.

Cultures : B. ordinaire, B. glucosé aéro-anaérobie : *stérile.*

B. ordinaire + Pénicillinase, B. glucosé + Pénicillinase : *streptocoque* à grains très fins.

B. glucosé anaérobie + Pénicillinase : *stérile.*

(1 goutte de Pénicillinase Subtilis en solution à 1/10 en citrate de soude, lot L).

Donc :

Culture possible seulement en présence de Pénicillinase.

OBSERVATION XVII

L..., Neuro-chirurgie (Professeur Lazorthes).

Méningite aiguë.

Examen N° 259 du 16/2/48 : L.C.R. après pénicillinothérapie 200.000 U.O. I.M. à raison de 50.000 U.O. toutes les 3 h. Pas de pénicillinothérapie intrarachidienne.

Ex. direct : Polynucléaires peu altérés, quelques lymphocytes, très rares diplocoques Gram +.

Cultures : B. ascite : *pneumocoque.*
B. ascite + Pénicillinase (1 goutte lot L) : *pneumocoque.*

Pénicillino-sensibilité : 0,08 U.O./c.c. (Spécilline G 1301, déc. 1950, 1.600 U/mg. Bouillon T., ensemencement 10^{-3}. Lecture après 24 h. à 37°).

Cultures identiques avec et sans Pénicillinase.

OBSERVATION XVIII

A..., Saint-Jean, Médecine Sud (Professeur Tapie) et Neuro-Chirurgie (Professeur Lazorthes).

Abcès du cerveau.

Examen N° 389 du 1/3/48 : avant toute pénicillinothérapie.

Ex. direct : Nombreux polynucléaires peu altérés, quelques monocytes, rares lymphocytes, nombreux débris cellulaires, pas de germe visible.

Cultures : B. ord. : *stérile.*

Examen N° 515 du 11/3/48 : après pénicillinothérapie.

Ex. direct : Polynucléaires altérés, très nombreux cocci en grappes altérés, intra et extra-cellulaires.

Cultures : B. glucosé : culture peu abondante.
B. glucosé + Pénicillinase (1 goutte lot L, dilution 1/10 en citrate Na) : culture peu abondante.
B. glucosé + Pénicillinase + Ac. p.a.b. (1 goutte lot L, dilution 1/10 en citrate Na + Ac.p.a.b. 1/1.000) : culture très abondante.
Staphylocoque doré.

Pénicillino-sensibilité : 2.500 U.O./c.c. (Spécilline G, 1301, déc. 1950 en glucose P.S.P., 24 h., inoculat 10^{-3}).

Culture plus abondante en présence de Pénicillinase et d'acide para-amino-benzoïque.

Examen N° 537 du 15/3/48 : après pénicillinothérapie mêmes doses.

Ex. direct : Polynucléaires très altérés contenant de très nombreux staphylocoques abîmés intra-cellulaires.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase. *Staphylocoque.*

Pénicillino-sensibilité : 2.500 U.O./c.c. (mêmes conditions que 515).

Examen N° 558 du 16/3/48 : après pénicillinothérapie, mêmes doses et streptomycine générale et locale.

Ex. direct : Polynucléaires picnotiques, pas de germes visibles.

Cultures : B. glucosé ± Pénicillinase : *stériles* en 10 jours.

Cultures identiques avec et sans Pénicillinase.

Cette liste fait donc état de 47 examens pratiqués pendant ou immédiatement après la pénicillinothérapie chez dix-huit malades. Elle se rapporte uniquement à des sujets dont les examens étaient positifs avant l'administration de l'antibiotique. Dans les cas où le traitement avait été entrepris avant la confirmation bactériologique, nous n'avons tenu compte évidemment que des cas où l'un au moins des examens pratiqués s'est montré positif.

Ces réserves préliminaires étant faites, nous pouvons tenter une analyse de ces résultats.

Sur ce total de 47 examens :

Dans un premier groupe de trente (soit 64 %), les résultats sont identiques avec et sans addition de Pénicillinase au milieu de culture :

— Vingt-cinq (soit 53 %) sont également positifs;

— Cinq (soit 11 %) sont négatifs dans les deux cas.

Dans un deuxième groupe de dix-sept (soit 36 %), les résultats diffèrent et se répartissent de la façon suivante :

— Dans onze cas (soit 23 %), l'ensemencement est positif en présence de Pénicillinase et négatif en l'absence du principe antipénicilline dans le milieu de culture.
— Dans cinq cas (soit 11 %), la croissance microbienne est plus rapide ou plus abondante en présence de l'enzyme antibactériostatique.
— Dans un cas (soit 2 %), l'ensemencement positif en milieu ordinaire est négatif dans le même milieu additionné de Pénicillinase.

Si on tente de rapporter ces résultats au nombre des malades et non plus au nombre des prélèvements examinés, à condition de ne tenir compte que du premier examen pratiqué — le seul qui présente un intérêt diagnostique —, on obtient les résultats suivants :

Sur ce total de dix-huit malades :

Chez trois d'entre eux (soit 17 %), les résultats sont également positifs, que l'on ajoute ou non la Pénicillinase au milieu au moment de l'ensemencement.

Chez quinze d'entre eux (soit 83 %), les résultats diffèrent et se répartissent ainsi :

— Dans onze cas (61 %), les cultures ne sont positives qu'en présence de Pénicillinase.
— Dans trois cas (17 %), les cultures sont plus rapides et plus abondantes en présence de l'enzyme antipénicilline.
— Dans un cas (5 %), la culture est stérile en présence de Pénicillinase et positive en milieu ordinaire.

En somme chez quatorze malades sur dix-huit (soit 78 0/0), l'addition de Pénicillinase au milieu de culture a permis de donner une réponse bactériologique plus sûre et plus précoce; par la technique ordinaire, les résultats auraient été douteux, tardifs ou inexacts.

Il est tentant de comparer sur un tableau nos résultats à ceux de Dowring et Hirsh (Tableau XIII).

Mais cette comparaison est très artificielle.

— D'une part, le nombre des cas rapportés est beaucoup trop réduit pour permettre d'en tirer des conclusions et de calculer des pourcentages valables.

TABLEAU XIII

Utilisation de la Pénicillinase pour la mise en culture de produits provenant de malades soumis à la Pénicillinothérapie

MILIEUX	PENICILLINASE +	PENICILLINASE −	PENICILLINASE +	PENICILLINASE −	PENICILLINASE +	PENICILLINASE −	PENICILLINASE +	PENICILLINASE −
CULTURES	++	−	++	+	++++ ou − −		−	+
Statistique de Dowling et Hirsch (sur 26 malades)	8		4		14		0	
	31 %		15 %		54 %		0	
	46 %							
Statistique personnelle (sur 18 malades)	11		3		3		1	
	61 %		17 %		17 %		5 %	
	78 %							

— D'autre part, ces statistiques ne sont pas établies sur les mêmes bases.

Dowling et Hirsh se basent sur le nombre important de 186 examens : ils pratiquent, en effet, de très nombreux prélèvements successifs chez un même malade; les premiers sont effectués tôt après l'administration de la première dose de l'antibiotique; ils sont ensuite répétés à des intervalles très rapprochés.

Nous n'avons pu personnellement procéder, dans des conditions aussi favorables, à l'exception des malades que nous avons pu suivre de près et chez lesquels nous avons pu multiplier les prélèvements (à une fréquence beaucoup moindre cependant que celle des auteurs américains); les autres examens ne nous sont, le plus souvent, parvenus que dans la mesure où le clinicien attendait du bactériologiste une aide pour le diagnostic.

Nous avons volontairement éliminé de notre liste trente-huit examens pratiqués chez six malades atteints d'infections causées par des germes insensibles à la pénicilline :

Une endocardite bactérienne subaiguë à entérocoque (treize hémocultures);

Deux méningites à pneumobacille de Friedlander (vingt-deux examens);

Deux septicémies à colibacille (deux hémocultures);

Une septicémie à bacille d'Eberth (une hémoculture).

Les prélèvements effectués chez ces malades ont été pratiqués au cours de la pénicillinothérapie; nous avons donc ensemencé les produits organiques sur des milieux contenant de la Pénicillinase et à titre de comparaison sur les milieux usuels. Les cultures se sont révélées identiques dans les deux cas, l'identification du germe et l'étude de sa sensibilité à la pénicilline ont confirmé qu'il n'était inhibé que par des concentrations importantes de l'antibiotique et par conséquent que l'addition de Pénicillinase au milieu de culture était absolument sans intérêt.

C'est pourquoi nous n'avons pas cherché à allonger la liste des résultats que nous rapportons et nous nous sommes limités aux germes appartenant à des espèces sensibles à la pénicilline.

Il est possible, dans ces conditions, de rechercher les affections représentées dans la statistique de Dowling et Hirsh *et dans la notre* (Tableau XIV.).

Il apparaît nettement sur ce tableau que les espèces bactériennes en cause sont les mêmes dans les deux statistiques. Il s'agit de cocci Gram positifs qui sont, en règle générale, hautement pénicillino-sensibles. Dowling et Hirsh ne donnent, dans leur publication, aucun renseignement sur la pénicillino-sensibilité des souches rencontrées. Nous n'avons pu, personnellement, pratiquer ce test dans tous les cas car certains germes fragiles ont poussé de façon trop insuffisante au cours des repiquages ultérieurs. Néanmoins, il ressort des quelques cas où cette détermination a pu être faite que la pénicillino-sensibilité des germes en cause varie dans des proportions importantes :

TABLEAU XIV

Etude comparative des affections en cause dans la statistique de Dowling et Hirsch et dans la nôtre

GERMES	AFFECTIONS	STATISTIQUE DE DOWLING ET HIRSH	STATISTIQUE PERSONNELLE
Streptocoques	Septicémies	6	5
	Pleurésies	0	1
	Méningites	0	1
	Suppurations div...	1	1
	Total.....	7	8
Pneumocoques	Septicémies	5	0
	Pleurésies	3	2
	Méningites	5	2
	Total.....	13	4
Staphylocoques	Septicémies	3	1
	Pleurésies	1	0
	Suppurations div...	2	5
	Total.....	6	6

— Certaines souches sont hautement pénicillino-résistantes :

Observation VII. — Staphylocoque 977 : 12,5 U.O./c.c.
Observation XVIII. — Staphylocoques 515, 537 : 2.500 U.O./c.c.

— Certaines présentent une insensibilité relative à la pénicilline :

Observation XII. — Staphylocoque 88 : 2.5 U.O./ c.c.

—D'autres, au contraire, présentent une pénicillino-sensibilité élevée :

Observation III. — Staphylocoque 384 : 0,01 U.O./c.c.
Observation IV. — Streptocoque 452 : 0,02 U.O./c.c.
Observation V. — Pneumocoque 784 : 0,08 U.O./c.c.
Observation VIII. — Staphylocoque 1032 : 0,08 U.O./c.c.
Observation XI. — Staphylocoque 44 : 0,01 U.O. c.c.
Observation XVII. — Pneumocoque 259 : 0,08 U.O./c.c.

On conçoit aisément que des souches peu sensibles à la pénicilline puissent donner des cultures positives lorsque le

prélèvement a été effectué au cours de la pénicillinothérapie. Ce sont précisément celles-là qui fourniront des résultats comparables, que l'on ajoute ou non de la Pénicillinase au milieu de culture au moment de l'ensemencement.

Le fait que des germes hautement sensibles puissent cultiver grâce à l'addition de Pénicillinase lors de l'ensemencement de produits biologiques provenant d'un sujet soumis à la pénicillinothérapie, constitue un argument de poids en faveur de cette technique.

Nous pensons cependant qu'il ne faut pas se hâter, devant ces résultats brillants, de parler de succès certain et de voir là une « recette » infaillible.

On doit se garder de généraliser trop vite en face du petit nombre d'observations concluantes que nous rapportons, car nous ne pouvons, en parallèle, présenter la liste de toutes les réponses négatives, en particulier de toutes hémocultures restées stériles. Une telle confrontation est impossible.

En effet, le laboratoire reçoit un nombre important d'hémocultures :

D'une part, il s'agit rarement d'affections réellement septicémiques, le plus souvent ces prélèvements proviennent de malades entrés à l'hôpital avec une pyréxie aiguë et pour lesquels, en l'absence de diagnostic clinique, on demande au laboratoire un critère bactériologique. On attend souvent de lui l'impossible...

D'autre part, lorsqu'il s'agit d'affections septicémiques dont on veut préciser l'étiologie ou contrôler la thérapeutique, même lorsque toutes les précautions ont été prises pour le prélèvement, le transport et l'ensemencement, il arrive souvent que le laboratoire soit en défaut. Malgré les progrès que représentent les techniques modernes d'ensemencement sur des milieux riches, malgré l'addition de Pénicillinase et d'acide para-amino-benzoïque lorsque le malade a déjà reçu de la pénicilline ou des sulfamides, il semble qu'un certain nombre d'hémocultures restent anormalement stériles. Il est peut-être abusif de penser que dans tous ces cas la pénicilline a stérilisé le sang circulant, il serait peut-être plus juste d'invoquer aussi les insuffisances de la technique...

TECHNIQUE

En règle générale, tous les prélèvements reçus au laboratoire pour hémoculture nous parviennent sous la forme de sang citraté (15 c.c. environ de sang en 2 c.c. d'une solution de citrate de soude à 2 %) en tubes. L'échantillon est ensemencé, en général, dans l'heure qui suit la prise de sang et il est toujours conservé à l'étuve à 37° dans l'intervalle qui précède le transfert au laboratoire.

L'ensemencement est alors pratiqué toujours sur milieux liquides, quelquefois sur milieux solides.

Nous utilisons couramment le bouillon ordinaire à 3 ‰ et le « *Brain Heart Infusion Difco* ». Ces milieux sont répartis en tubes ordinaires longs et en tubes d'Yvan Hall préalablement régénérés à l'ébulition de façon à réaliser une anaérobiose convenable.

Nous ensemençons chaque tube avec 2 c.c. environ de sang citraté. Dans ces conditions, le total du prélèvement se trouve réparti sur six à huit tubes, ce qui permet de diminuer les risques éventuels de contamination. On peut ainsi ensemencer sur des milieux différents, n'ajouter Pénicillinase, acide para-amino-benzoïque ou les deux facteurs que dans certains tubes et comparer les résultats à ceux obtenus en milieu ordinaire. Un gros avantage est encore la possibilité de ne pratiquer de repiquages qu'à partir du contenu de l'un des tubes lorsqu'on veut s'assurer de la croissance et de pouvoir conserver les milieux ensemencés à l'étuve pendant un laps de temps très long.

La Pénicillinase est utilisée chaque fois que l'on possède la notion que le malade a déjà reçu ou risque d'avoir reçu une thérapeutique locale ou générale par la pénicilline. Avec la généralisation de cette médication, il y aura probablement intérêt, dans un avenir très prochain, à procéder ainsi de façon systématique.

La préparation titrée au point de vue de son activité antipénicilline dès le jour de la filtration est conservée à la glacière en ampoules scellées de 1 c.c. Etant donné l'impossibilité de pratiquer une stérilisation par la chaleur, il importe de s'entourer de toutes les précautions possibles :

— Un test de stérilité est fait dès la filtration avant la répartition en ampoules.

— Chaque fois qu'on a besoin de Pénicillinase, on utilise une ampoule que l'on ouvre pour la circonstance et qui, ensuite, est jetée et non refermée. On pratique également un ensemencement de contrôle sur bouillon pour s'assurer de la stérilité pour le cas où seuls les milieux additionnés de Pénicillinase montreraient une croissance microbienne.

Ce risque de contamination de la Pénicillinase reste le gros écueil; il peut résulter, en effet :

— Soit d'une stérilisation imparfaite par la bougie par suite du passage de quelques spores dans le filtrat.

— Soit de contamination en cours de répartition et d'utilisation des ampoules.

Nous avons rencontré à plusieurs reprises des difficultés par suite de souillures de nos préparations; c'est pourquoi nous insistons à nouveau sur la nécessité de ce contrôle de la stérilité et l'avantage qu'il y a à *pratiquer toujours les ensemencements en parallèle sur milieu ordinaire et sur le même milieu additionné de Pénicillinase.*

La question de la quantité de Pénicillinase à ajouter ne soulève guère de difficultés étant donné la puissance de nos filtrats. Une goutte de la préparation pure ou diluée à 1/10e suffit largement à neutraliser l'activité antibiotique de la faible quantité de pénicilline contenue dans le prélèvement.

Nous avons vérifié ce point de détail en pratiquant par la méthode de Sureau (122) de nombreux dosages de pénicilline dans le sang ou les liquides organiques.

Dans le *sang*, le taux maximum qu'il est possible de rencontrer ne dépasse pas, en pratique 4 U.O./c.c., ce qui correspond, en moyenne, à un prélèvement pratiqué dans le quart d'heure qui suit l'injection intra-musculaire de 100.000 U.O. Après injections intra-veineuses, ce taux peut être beaucoup plus élevé immédiatement après l'injection, mais il décroît ensuite très rapidement.

Dans les pus d'abcès, les liquides pleuraux ou céphalo-rachidiens, les concentrations antibiotiques peuvent être plus élevées.

Dans les *pus d'abcès* après injection locale de pénicilline, les taux peuvent être considérables. Pour notre part, nous n'avons jamais trouvé de taux supérieurs à 8 U.O./c.c.

mais Selbie (115) cite un cas d'abcès du sein où quarante-huit heures après l'injection locale de 20.000 unités, la dilution bactériostatique était encore de 1/130.000.

Dans les *pus de pleurésies purulentes*, la concentration antibiotique est faible si le malade ne reçoit la pénicilline que par voie intra-musculaire; elle existe cependant et il faut en tenir compte (0,24 U.O./c.c. avec 20.000 U.O.I.M. toutes les trois heures, dans une de nos observations).

Evidemment, le taux peut être beaucoup plus considérable lorsque — ce qui est la règle — l'injection locale est associée à la thérapeutique générale.

Avec les *liquides céphalo-rachidiens*, les résultats sont très comparables : taux limite d'inhibition avec la seule voie parentérale, concentrations élevées par l'utilisation de la voie rachidienne.

Dans les *urines*, les concentration très élevées sont la règle — de l'ordre de 2.000 U.O./c.c. — dans l'heure qui suit l'injection mais avec de très grosses variations individuelles.

On voit donc que nos filtrats sont d'une activité très suffisante pour l'utilisation clinique. Les concentrations antibiotiques encore diminuées par la dilution de l'ensemencement sont largement neutralisées par une goutte de nos préparations s'il s'agit de pus ou de sang. Dans le cas d'hémocultures, les dilutions au 1/10e en citrate de soude ont encore une activité très suffisante. Dans le cas — très rare — de la recherche d'un germe sensible dans les urines, il peut être utile d'ajouter une quantité plus importante de Pénicillinase.

En résumé, en l'état actuel de la question, le gros inconvénient est la difficulté de stérilisation de la Pénicillinase Subtilis. C'est pourquoi toutes les tentatives faites pour éviter cet écueil et utiliser en bactériologie clinique un produit standardisé et stérilisable ont retenu notre attention.

J. Parat (97) exposant aux entretiens de Bichat la pratique actuelle du traitement de l'endocardite maligne et la nécessité d'une technique rigoureuse de l'hémoculture, précise : « *Si le malade a déjà reçu de la Pénicilline on aura, au préalable, aspiré dans la seringue 1 c.c. d'une solution de cystéine à 1 0/0 qui se mélangera au sang.* »

Etant donné les restrictions apportées par Hirsch et O. Neil (62) à l'activité antipénicilline du chlorhydrate de cystéine, nous n'avons pas utilisé cette technique en pratique courante et nous avons toujours pratiqué les ensemencements d'exsudats pouvant contenir de la pénicilline en ajoutant de la Pénicillinase au milieu de culture.

En raison des inconvénients que nous avons signalés, en particulier l'absence de standardisation et la difficulté de la stérilisation de la Pénicillinase-Subtilis, la méthode proposée par Parat présenterait une supériorité certaine. Nous avons cherché à en vérifier l'efficacité dans une série de tests portant sur l'action antipénicilline comparée de la cystéine et de la Pénicillinase-Subtilis en présence de sang.

Nous ne détaillerons que l'un de ces essais :

A trois tubes de sang citraté correspondant très exactement à ceux qui sont adressés au laboratoire pour les hémocultures, nous ajoutons 0,1 c.c. d'une solution de pénicilline à 1.000 U.O./c.c. de façon à réaliser une concentration finale de 10 U.O./c.c.

Nous ajouterons encore au premier 1 c.c. d'une solution de chlorhydrate de cystéine à 1 % et au second 1 c.c. d'une solution de Pénicillinase-Subtilis diluée à 1/10. Le troisième ne reçoit aucun facteur antipénicilline et sert de témoin (Tableau XV).

TABLEAU XV

Mélanges : sang citraté pénicilliné et Pénicillinase ou Cystéine.

MELANGES	I	II	III
Sang cc.....	8	8	8
Citrate Na 2 % cc.....	2	2	2
(1) Pénicilline 1.000 U. O/cc.	0,1	0,1	0,1
(2) Cystéine cc.....	0	1	0
(3) Pénicillinase Subt. cc	0	0	1

(1) Spécilline G (Lot 1301, exp. : déc. 1950, 1.600 U/mg.), solution en eau physiologique 1.000 U. O./cc.

(2) Solution de chlorhydrate de cystéine à 1 % pH 7,5.

(3) Pénicillinase Subtilis, lot L, dilution à 1/10 en solution tampon phosphatée pH7 et conservée 2 mois à la glacière.

TABLEAU XVI

Dilution en série

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Bouillon glucosé ensemencé cc. (1).....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mélange au sang cc.....	1	On passe en série 1 cc. du 1er au 10e tube inclus.									0
Taux de dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	0
Résultats après 24 h. à 37°.											
Mélange I	—	—	—	—	—	—	—	+	++	+++	+++
Mélange II.....	—	—	—	—	—	—	+	+	++	+++	+++
Mélange III....	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Pénicilline, solut. en eau phys. 10 U. O/cc....	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+++	+++
Taux de pénicilline (U. O/cc)	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	0,019	0,009	0

(1) Bouillon glucosé additionné de 0,1 cc. d'une culture en bouillon de 24 h. de **Staphylococcus Aureus H** pour 10 cc. de milieu.

Nous apprécions par la technique des dilutions en série le taux inhibiteur de chaque mélange sur le *Staphylococcus Aureus II* en bouillon glucosé après vingt-quatre heures d'étuve à 37° et nous comparons les résultats obtenus (Tableau XVI).

Dans les conditions de cette expérience, il semble donc que l'action antipénicilline de la cystéine sur la pénicilline en présence de sang citraté soit nulle ou minime en regard de l'activité notable de la Pénicillinase-Subtilis.

Nous avons repris ce test en respectant un certain temps de latence entre le moment du mélange et celui de l'ense-

mencement dans la technique de dilution. Après vingt-quatre heures de contact des mélanges à l'étuve à 37° ou sur la table du laboratoire les résultats sont assez comparables. L'activité inhibitrice de chacun des mélanges a nettement diminué mais il n'y a qu'un tube de différence entre le sang pénicilliné avec et sans cystéine et la croissance est notée dans tous les tubes où l'on a ajouté de la Pénicillinase.

Bien entendu, si on ensemence avec le staphylocoque sensible et si on attend vingt-quatre heures d'incubation à 37° pour ajouter le facteur antipénicilline, les résultats diffèrent totalement. Il y a inhibition au même taux dans tous les tubes. Pas plus que la Pénicillinase-Subtilis, la cystéine ne provoque un effet réversible sur l'action antibiotique exercée par la pénicilline à cette concentration. Evidemment si le mélange sang citraté-pénicilline est conservé à la glacière après l'ensemencement, il en est autrement et la Pénicillinase-Subtilis affirme sa supériorité sur la cystéine car la pénicilline n'a pu avoir d'action bactéricide sur le germe dans ces conditions.

En résumé, dans le cadre de notre étude, nous n'avons pu vérifier l'efficacité de la méthode proposée par J. PARAF et c'est pourquoi nous sommes restés fidèles à celle de la Pénicillinase malgré ses difficultés techniques.

II. — DOSAGES DE PENICILLINE

La Pénicillinase peut intervenir comme cause d'erreur dans la pratique de certains dosages de pénicilline dans les liquides organiques.

DANS LE SANG

Les méthodes habituellement utilisées pour doser la quantité de pénicilline présente dans le sang du malade soumis à la pénicillinothérapie consistent à mesurer l'activité inhibitrice du sérum vis-à-vis d'une souche sélectionnée dont la haute pénicillino-sensibilité est connue avec précision. *Staphylococcus Aureus* (122), *Streptococcus Hemolyticus* (107), *W. Perfringens* (104), etc.

Or, différentes causes d'erreur sont pratiquement inévi-

tables quelle que soit la technique employée car elles résultent de la présence du sérum sanguin lui-même. D'une part celui-ci apporte son pouvoir bactériostatique propre (36); d'autre part, Chandler et ses collaborateurs (28) ont montré qu'il peut contenir un principe antipénicilline qui paraît identique à la Pénicillinase.

Quoi qu'il en soit, la technique classique de B. Sureau, précisée et largement utilisée par Chabbert (25) donne des résultats parfaitement utilisables en pratique. Nous avons effectué un nombre important de dosages avec cette technique soit pour contrôler une pénicillinothérapie, soit pour étudier l'action des solvants retards; elle nous a toujours donné satisfaction et les résultats trouvés cadrent parfaitement avec ceux rapportés par d'autres auteurs.

DANS LES URINES

Il est évident que la présence de germes du groupe colibacille s'accompagnera d'une perte rapide d'activité quand le prélèvement sera conservé à la température de la pièce. Mais Herrel et ses collaborateurs (59) ont noté que dans quelques cas une urine contenant des bacilles coliformes et dans laquelle la concentration de pénicilline était très élevée tout de suite après l'émission — taux de l'ordre de 120 U.O./c.c. — avait complètement perdu son activité bactériostatique après conservation une nuit à la glacière.

Laboratoire spécialisé

TEST DE STERILITE DE LA PENICILLINE

L'instabilité de la pénicilline à des températures élevées, sa destruction par les antiseptiques rendent impossible sa stérilisation par les procédés habituels. Ce n'est que dans une asepsie aussi rigoureuse que possible au cours des opérations industrielles d'extraction chimique, de séchage

et de conditionnement qu'il faut rechercher la stérilité nécessaire à un produit presque exclusivement réservé à l'administration par voie parentérale.

Si considérable que soit le pouvoir bactéricide de la pénicilline, si étendu que soit son spectre antibiotique, tous les germes ne sont pas sensibles à son action ou n'y sont pas également sensibles et le contrôle de la stérilité d'une préparation commerciale de pénicilline est exigé du fabricant. Les prescriptions officielles imposent, en effet, en France, un contrôle biologique de la préparation assez comparable, dans ses grandes lignes, au *Therapeutic Substances Act* de Grande-Bretagne et au règlement de la *Food and Drug Administration* des Etats-Unis. On peut, avec Courtade (31) le schématiser ainsi :

1° *Le test de puissance.* — Détermination du nombre d'unités Oxford par milligramme de poudre, par les méthodes classiques de dosage.

2° *Le test de stérilité* qui fait intervenir la neutralisation de l'antibiotique par un principe antipénicilline.

3° *Le test d'absence de substances pyrogènes.*

4° *Le test de non-toxicité.* — Ces deux derniers tests sont pratiqués par inoculation intra-veineuse à l'animal.

5° *Le test intradermique* qui n'est pas prévu par les législations anglo-saxonnes, a été mis au point par Reilly et est actuellement utilisé au Centre Cabanel de Fabrication de la pénicilline. Il a pour but d'éliminer les préparations qui, à la suite de mutations spontanées de *Penicillium Chrysogenum* peuvent contenir des substances qui, bien que non pyrogènes et non toxiques au point de vue général, ont cependant une action nécrosante locale.

La nécessité d'un *Test de stérilité de la pénicilline* paraît d'autant plus justifiée que H. Proom (105) a montré que *des germes hautement sensibles une fois desséchés peuvent survivre au contact de la pénicilline en poudre* et, lors de la dissolution de la drogue, subsister pendant une courte période au sein de la solution antibiotique. La diminution de la concentration de pénicilline après injection dans l'organisme par suite de la dilution et de l'excrétion, peut

abaisser la pénicillinémie à un niveau permettant aux germes de se multiplier.

L'expérimentation de Proom a porté sur des pneumocoques pénicillino-sensibles incorporés à de la poudre de pénicilline. Des dilutions sont faites en bouillon à intervalles variés et placées ensuite à l'étuve à 37°. La culture microbienne est constatée après des périodes de dix-huit heures à dix semaines, durant lesquelles pneumocoques et poudre de pénicilline desséchée sont restés en contact. Si une dilution de bouillon contenant 200 U.O./c.c. de pénicilline est injectée par voie intra-veineuse au lapin, l'auteur obtient des résultats variables avec le temps écoulé entre le moment où se fait la dilution en bouillon et celui de l'injection. Si celle-ci est pratiquée aussitôt après, l'animal meurt dans le même temps que le témoin inoculé avec la culture de pneumocoques sans pénicilline; si l'injection est pratiquée vingt minutes après, l'animal survit : les germes ont été détruits par la pénicilline durant ce laps de temps car lorsqu'on ajoute, au bout de ce délai, de la Pénicillinase pour détruire la pénicilline présente, l'animal ne meurt pas.

La survie de germes pénicillino-sensibles présents dans le produit ne paraît donc pas, en pratique, devoir constituer un risque sérieux pour l'emploi de ce médicament. Cependant, en toute rigueur, et surtout dans l'éventualité de la présence de germes moins sensibles ou hautement résistants, il convient d'user d'un test de stérilité capable d'indiquer la présence de tout germe dans la pénicilline desséchée.

D'autre part, la possibilité de souiller certaines solutions de pénicilline au cours des manipulations destinées à l'administration thérapeutique, les cas trop fréquents de contamination par la seringue peuvent amener, dans certaines circonstances, le laboratoire de bactériologie clinique à avoir à pratiquer ce test sur des solutions de pénicilline.

Il faut évidemment inactiver complètement le pouvoir bactériostatique de la préparation en cause si l'on veut voir se développer sur le milieu nutritif où on les portera, les germes contaminants qui auront plus ou moins résisté à son action bactériostatique. Il faut, naturellement, que la méthode employée soit sans effet sur ces germes et ne les détruise pas en même temps que la pénicilline comme le ferait la chaleur par exemple.

A la suite des travaux d'Abraham et Chain (1) sur la *Pénicillinase*, Harper (56) avait proposé d'utiliser cet enzyme pour faire disparaître la pénicilline des milieux de culture. Elle pourrait, théoriquement, servir pour pratiquer le test de stérilité d'une préparation commerciale de pénicilline, mais la technique systématique d'un test réclame l'emploi d'un produit standardisé d'activité connue ce qui, malgré les tentatives de Ungar (123), Liebmann (83), Mac Quarrie et Perlstein (86) n'est pas encore le cas pour les préparations actuelles de Pénicillinase.

C'est pour répondre à cette critique que Lawrence (75) avait proposé sa *clarase;* nous avons vu ce que, de l'avis même de cet auteur (76), on peut en penser.

Plus récemment Cavallito et Bailey (23) ayant observé l'action antibactériostatique de la *Cystéine* et des composés voisins, Hickey (60) a proposé l'utilisation de cette substance dans la pratique du test de stérilité. Il a montré l'efficacité antipénicilline d'une solution à 2 % de chlorhydrate de cystéine mise une heure à 37° au contact de la solution de pénicilline, le mélange étant ensuite éprouvé en présence de *Staphylococcus Aureus* ensemencé sur le milieu américain classique au thioglycollate de Brewer.

Muir et Valley (95) décrivent une technique qui fait intervenir également une solution de chlorhydrate de cystéine à 2 % en présence de petite quantité de peptone stérile. Cette méthode paraît intéressante car elle utilise un composé de structure connue, d'un prix de revient bas et stérilisable à l'autoclave. C'est elle qui est actuellement utilisée au Centre Cabanel de Fabrication de la Pénicilline (22) (31). La technique employée est, à quelques détails près, celle proposée par les auteurs américains.

On prépare une solution à 2 % de chlorhydrate de cystéine tamponnée à pH 7,5 ($NaOH + KH^2PO^4$), la réaction est ajustée à ce pH par addition de soude à 10 %. Cette solution de cystéine est placée dans des tubes Pyrex de 15 m.m., à raison de 10 à 15 c.c. et stérilisée à l'autoclave pendant 10 minutes à 15 livres de pression. Une solution aqueuse de peptone à 5 % est aussi stérilisée à l'autoclave. L'échantillon de pénicilline est dissous dans l'eau stérile à la concentration de 5.000 U.O./c.c. Après

refroidissement, 2 c.c. de la solution de cystéine sont mélangés à 1 c.c. de la solution de pénicilline dans un tube stérile : on ajoute également 0,15 c.c. de peptone stérile à 2 %. Ce mélange est laissé 30 minutes à la température du laboratoire et transvasé aseptiquement dans 20 c.c. de milieu liquide au thioglycollate de solium (Milieu de F.-H. Brewer). On laisse à l'étuve à 37° pendant 7 jours.

Ces auteurs ont contrôlé l'efficacité de cette méthode en ensemençant le mélange avec des organismes susceptibles de cultiver sur le milieu au thioglycollate; ils ont obtenu des cultures avec des ensemencements de 35 éléments de *Staphylococcus Aureus*, 15 spores de *Bacillus Subtilis*, 15 à 25 spores de *Clostridium Sporogenes*.

Les solutions stériles de cystéine, toujours d'après les mêmes auteurs, garderaient leur activité pendant plus d'une semaine si elles sont conservées en tube Pyrex à la température ordinaire. Ils préconisent cependant l'emploi de solutions fraîches datant de moins de quatre jours. Ils estiment que 2 c.c. de solution de cystéine à 2 % suffisent à neutraliser en trente minutes l'action antibactérienne de 15.000 U.O. de pénicilline.

Leurs essais de simplification de ce test, en ajoutant du chlorhydrate de cystéine à des milieux divers, avec ou sans thioglycollate n'ont pas été couronnés de succès.

RECUPERATION DE LA PENICILLINE

Au moment où ce médicament ne pouvait être fabriqué en France et était encore rare et coûteux, des tentatives originales ont été faites pour le récupérer dans les urines des malades soumis à la pénicillinothérapie. Ces efforts sont relatés en détail dans l'ouvrage de Broch et ses collaborateurs du Centre Militaire d'Etude et de Fabrication de la Pénicilline (20) et dans la thèse de Becuwe (8) effectuée sous la direction de Sureau dans le service de M^me^ Tréfouel à l'Institut Pasteur.

Décrivant la technique de la collecte des urines et le procédé de récupération du médicament, ces auteurs insistent sur la nécessité de précautions rigoureuses pour éviter la contamination des urines par le colibacille, la multiplica-

tion de ce germe et l'élaboration par celui-ci de la Pénicillinase. Ils ont mis au point l'addition de chloroforme et d'une solution de tampon phosphaté de pH 6,1 le stockage à la glacière pour éviter la pullulation microbienne et également pour empêcher — écrivent ces auteurs — l'action de la Pénicillinase.

De toutes façons, la connaissance de la Pénicillinase-Coli explique que toute récupération de pénicilline paraisse difficile, sinon impossible dans les urines de malades atteints de colibacillose.

Intérêt thérapeutique

La connaissance de la Pénicillinase, principe antipénicilline d'origine bactérienne, nous paraît avoir un certain intérêt thérapeutique.

— Elle souligne l'inconvénient de la contamination des préparations de l'antibiotique destinées au traitement du malade.

— Elle contre-indique la pénicillinothérapie locale de plaies contaminées par des germes pénicillino-résistants élaborant une Pénicillinase.

— Elle explique en partie l'échec des tentatives d'administration de l'antibiotique par la voie intestinale et justifie certains essais de pénicillinothérapie-retard.

CONTAMINATION DES PREPARATIONS DE PÉNICILLINE

Les solutions destinées à l'usage thérapeutique peuvent être, au moment de la préparation, contaminées par un germe de l'air (du groupe Subtilis) ou de l'eau (du groupe Colibacille).

Dans le premier cas, le seul inconvénient est la destruction possible d'une partie de la pénicilline, surtout si la solution est conservée pendant quelques heures avant d'être administrée en totalité au malade; dans le second, il s'y ajoute le danger d'une infection grave pénicillino-résistante.

Nous avons personnellement noté à l'hôpital deux contaminations accidentelles de solutions de pénicilline. L'une d'elle est très démonstrative :

A l'époque où ce médicament était rare, nous ne disposions que de pénicilline colorée américaine et nous utilisions fréquemment des solutions de pénicilline préparées à l'hôpital : il restait quelques dixièmes de centimètre cube dans le flacon, le bouchon n'avait pas été enlevé, il avait seulement été perforé par l'aiguille pour permettre l'injection du solvant et l'aspiration de la quantité utilisée pour les injections. Or, voulant tester avec une de ces solutions à 10.000 U.O./c.c., la pénicillino-sensibilité d'un entérocoque, nous avons noté une fois sur une gamme de dilution allant de 500 à 1 U.O./c.c., que dans tous les tubes avait poussé un gros bacille Gram-positif à bouts carrés du genre anthracomorphe. Des frottis pratiqués sur le contenu de chacun des tubes de la dilution et colorés par la méthode de Gram nous ont montré, outre le gros bacille anthracomorphe, des entérocoques qui avaient poussé dans les tubes contenant des concentrations de pénicilline inférieures ou égales à 31 U.O./c.c. Or, nous avons vérifié, par la suite, que la souche d'entérocoque testée était normalement inhibée par la pénicilline à la concentration de 4 U.O. par c.c. Il y avait donc, dans ce cas particulier :

1° Souillure de la dilution par un germe de l'air qui, par la suite, s'est montré hautement pénicillino-résistant : ensemencé à la dilution 10^{-3} en eau peptonée Difco, il pousse en 24 heures en présence de 625 U.O./c.c. de pénicilline.

2° Diminution importante de l'activité antibactérienne de la pénicilline vraisemblablement en relation avec la contamination par ce bacille pénicillino-résistant. D'ailleurs, ce germe s'est montré apte à élaborer une pénicillinase extra-cellulaire filtrable, de puissance anti-pénicilline relativement faible, mais incontestable (1 c.c. de filtrat neutralise 1.250 U.O./c.c. de pénicilline).

Fleming fait remarquer que des échantillons non stériles d'eau distillée peuvent contenir de la Pénicillinase et que si une telle eau est utilisée pour la préparation de solution de pénicilline, elle doit être, au préalable, portée à l'ébullition et refroidie pour détruire l'enzyme présent.

Le même inconvénient de la présence de germes producteurs de Pénicillinase dans des préparations de l'antibiotique se pose pour les pommades à la pénicilline (50). Il importe donc d'assurer non seulement la stabilité mais la

stérilité des solutions destinées à la fabrication de ces pommades; on ne peut avoir recours au passage à l'autoclave, mais on peut utiliser avec profit la technique de stabilisation de la pénicilline proposée par Ramon et Richou (111) par addition de formol et chauffage trente minutes à 55°.

INFECTIONS POLYMICROBIENNES A GERMES PRODUCTEURS DE PENICILLINASE

La présence au niveau d'une plaie de germes producteurs de Pénicillinase tels que le pyocyanique ou le para-colon, qui détruisent la pénicilline appliquée localement, va, de même, empêcher une action efficace sur d'autres germes, en particulier sur des espèces pénicillino-sensibles : streptocoques et staphylocoques par exemple.

Nous avons eu nous-même l'occasion de vérifier, dans maintes circonstances l'importance de telles associations microbiennes; nous n'en donnerons que deux exemples :

1° Une suppuration pleurale à cocci pyogènes banaux surinfectée par *Ps. Æruginosa*, dont l'évolution n'a été nullement modifiée par la pénicillinothérapie générale et intrapleurale;

2° La méningite suppurée à streptocoque pénicillino-sensible surinfectée par *E. Coli*, dont nous avons rapporté en détail les examens bactériologiques (Observation n° IV). Nous avons noté, dans ce cas, la persistance du streptocoque dans le liquide céphalo-rachidien de cet enfant soumis à une pénicillinothérapie intensive et les dosages de pénicilline pratiqués sur le liquide ont montré un taux minime d'antibiotique malgré l'introduction, deux fois par jour, de doses importantes du médicament dans les espaces arachnoïdiens.

ADMINISTRATION DE LA PENICILLINE PAR LA VOIE INTESTINALE

L'obstacle le plus sérieux opposé à la pénicillinothérapie par voie buccale est la destruction par l'acidité gastrique. Mais l'administration directe dans l'intestin sous forme de

capsules glutinisées, par tubage duodénal ou encore par la voie rectale se heurte à la production de Pénicillinase par les germes saprophytes intestinaux du groupe Colibacille. Il serait peut-être intéressant, pour apprécier l'importance de ce facteur d'associer la pénicillinothérapie et la sulfamidothérapie intestinale en utilisant les dérivés à action anticolibacillaire du type phtalyl-sulfathiazol, par exemple.

PENICILLINOTHERAPIE-RETARD

Certains auteurs pensent même que la perte rapide de pénicilline qui suit son introduction par voie parentérale chez les malades peut être mise en partie sur le compte de son transport par le courant sanguin jusqu'à l'intestin où elle est détruite par la Pénicillinase bactérienne.

Reid et ses collaborateurs (112) ont proposé d'associer la pénicilline à du sulfanilate de soude, du benzoate de soude et quelques autres produits qui prolongeraient son action dans le sang au moyen d'une inhibition de la Pénicillinase.

Plus récemment, P. Mollaret, en 1947 (90), a proposé une nouvelle application pratique de la Pénicillinase sur le plan thérapeutique. Cet auteur, en effet, a proposé des règles nouvelles pour l'administration des antibiotiques : fortes doses d'emblée, arrêt brutal et, au premier indice de rechute, reprise du traitement avec une dose double. Ces principes sont en parfait accord avec le mécanisme d'action de la pénicilline et leur application sur le plan clinique donne les meilleurs résultats.

Pour faciliter l'agression par la pénicilline des germes *persistants* responsables de la rechute, Mollaret lance l'idée de l'utilisation d'une Pénicillinase de préférence cristallisée, d'activité mesurable et dont l'injection soit inoffensive. *La cessation brusque de l'antibiotique associée à l'administration d'une quantité convenable de Pénicillinase permettrait peut-être de restituer à l'organisme et à ces germes « persistants » leur virginité antérieure vis-à-vis de l'antibiotique*

INTÉRÊT DOCTRINAL : PÉNICILLINASE ET PÉNICILLINO-RÉSISTANCE

Nous avons vu, en exposant les différentes méthodes de préparation de la Pénicillinase, les techniques adoptées par les auteurs

Abraham et Chain (1), Harper (56), W. et M. Smith (116), Perault (99), utilisent des suspensions de germes broyés du groupe Coli-Paracolon.

Perault (98), Morgan et Campbell (92), Housewright et Henry (67), Sureau et Boyer (53) (121), filtrent des liquides de culture de germes sporulés de l'air du groupe Subtilis.

Il s'agit donc, jusqu'ici, de deux groupes seulement de microorganismes relativement insensibles à la pénicilline. Il peut être donc intéressant de préciser :

1° *Si d'autres espèces bactériennes ne peuvent également élaborer l'enzyme antipénicilline;*

2° *Quelle est la sensibilité à la pénicilline des souches produisant la Pénicillinase.*

Ces deux questions vont nous conduire à envisager tout d'abord la technique et les résultats de la recherche de la production de pénicillinase par les bactéries et ensuite la relation qui existe entre l'aptitude d'une souche microbienne à élaborer l'enzyme et sa susceptibilité vis-à-vis de l'antibiotique.

I. — Les germes producteurs de Pénicillinase

MÉTHODES

Fleming propose une technique originale de diffusion en gélose pour déterminer si un germe est ou non un bon producteur de Pénicillinase. Il ensemence les bactéries à étudier en différents points d'une boîte de gélose pénicillinée à raison de 2 U.O./c.c. Au bout de vingt-quatre heures, on ensemence un staphylocoque entre les zones de pousse. La pénicilline présente dans le milieu de culture inhibe la pousse du staphylocoque sauf dans la région où la Pénicillinase produite par le germe étudié a détruit la pénicilline.

C'est là une méthode purement qualitative mais qui est très démonstrative.

Une méthode plus précise a été proposée par Bondi et Dietz (15). Ces auteurs adoptent la technique classique de l'*Oxford cup*. On coule en boîte de Pétri la gélose ensemencée avec une souche sensible de *Staphylococcus Aureus;* on place dans les cylindres un mélange de solution de pénicilline et de culture du germe étudié, on prépare un témoin avec le mélange solution de pénicilline et bouillon stérile.

Après vingt-quatre heures d'incubation à 37°, on mesure le diamètre de la zone d'inhibition et on compare avec celui du témoin.

RÉSULTATS

Ce sont les résultats des auteurs américains que nous rapporterons en les résumant dans un tableau (Tableau XVII).

Nous nous bornerons à faire remarquer simplement quelques points essentiels :

Parmi les *Cocci* étudiés, qu'ils gardent ou non le colorant par la méthode de Gram, Bondi et Dietz ne rencontrent aucune souche produisant de la Pénicillinase. « On pouvait, déclarent ces auteurs, s'attendre à ce résultat puisque la plupart des infections produites par ces germes sont

TABLEAU XVII

Production de Pénicillinase par les bactéries

GERME!	NOMBRE DE SOUCHES étudiées	PENICILLI-NASE
Staphylococcus Aureus	5	—
Strepto. Hemolyticus A	3	—
Streptococcus Viridans	2	—
Enterococcus	2	—
Pneumococcus	1	—
N. Catarrhalis	2	—
N. Intracellularis	1	—
N. Gonorrheae	1	—
Bacillus Cereus	1	+
B. Subtilis	1	—
B. Megatherium	1	+
B. Anthracis	2	+
Clostridium	6	—
C. Diphteriae	1	—
Diphteroïdes	1	—
List. Monocytogenes	1	+
Esch. Coli	2	+
Aerob. Aerogenes	1	+
Para Colon	2	+
E. Typhosa	3	—
Salmonella	6	—
Shigella Dysenteriae	1	+
Shig. Paradysenteriae	3	+
Shig. Paradysenteriae	1	—
Shig. Sonnei	2	+
Shig. Newcastle	1	+
Proteus Vulgaris	3	—
Alk. Fecalis	1	+
Pseudomonas	3	—
Pseudomonas	3	+
Br. Bronchoseptica	1	—
Br. Melitensis	1	—
Hemo. Influenzae	2	—
Hemo. Pertussis	1	—

(D'après BONDI et DIETZ, 1944 (15).)

sensibles à la pénicillinothérapie. » Il est cependant possible de rencontrer des cocci élaborant le principe antipénicilline puisque ABRAHAM et CHAIN rapportent avoir trouvé un coccus. *M. Lysodekticus* détruisant la pénicilline.

En ce qui concerne les *Bacilles*,

Les bâtonnets Gram-positifs comprennent :

— Des germes sporulés aérobies dont beaucoup produisent de la Pénicillinase;

— Des *Clostridia* dont aucune souche ne détruit la pénicilline.

Les bactéries Gram-négatives comprennent un grand nombre d'espèces élaborant de la Pénicillinase; c'est le cas pour les bacilles coliformes, les souches du genre *Shigella*, à l'exception d'une souche de *Shigella Para-Dysenteriæ*. Par contre, aucun des germes étudiés appartenant au genre *Salmonella* ne produit l'enzyme antipénicilline. Bondi et Dietz notent qu'il pourrait y avoir là un procédé de différenciation utile : ainsi, par exemple, *Shigella Newcastle*, dont l'appartenance au genre *Shigella* est discutée par de nombreux auteurs, élabore la Pénicillinase comme la plupart des souches de ce groupe.

Soulignons que les espèces bactériennes produisant de la Pénicillinase sont nombreuses et largement répandues. En particulier, elles sont fréquentes parmi les bacilles Gram-négatifs saprophytes habituels de l'intestin. A l'exception des *Shigella* ces germes ne sont pas très pathogènes. C'est là un fait qui nous paraît important.

Ce tableau d'ensemble des bactéries produisant de la Pénicillinase, établi d'après les recherches de Bondi et Dietz est en parfait accord avec les résultats plus fragmentaires rapportés par d'autres auteurs.

Perault (98) vérifie que *E. Coli*, *Proteus Vulgaris*, *Pseudonomas Æruginosa* produisent une Pénicillinase intracellulaire alors que *Staphylococcus Aureus* n'élabore aucun principe antipénicilline.

Levaditi et Henry (81) étudiant deux souches de *Klebsiella Pneumoniæ* montrent que l'une n'élabore que des traces de Pénicillinase au bout de trente-cinq jours de culture et que l'autre est totalement inactive.

Bien que Himes et White (61) aient rapporté que seules les bactéries peuvent produire une Pénicillinase, Woodruff et Foster (129) ont montré que certains champignons, des actinomycètes et des levures peuvent aussi produire l'enzyme antipénicilline en quantités variables.

II. – Le rôle de la Pénicillinase dans la Pénicillino-Résistance

Toutes les fois que l'on emploie le mot de Pénicillino-résistance à propos d'une espèce ou d'une souche microbienne, il y a lieu de séparer deux ordres de faits très différents :

1° Tout d'abord, la *susceptibilité à la pénicilline d'une espèce microbienne donnée* Ellle a été étudiée par de nombreux auteurs et on possède actuellement une liste très complète de la pénicillino-sensibilité des différentes espèces bactriennes saprophytes et pathogènes.

Etudiant la concentration minimum de l'antibiotique qui inhibe complètement la pousse du germe, on est conduit à distinguer

— Des espèces hautement sensibles comme *N. Gonorrheæ*, *N. Meningitidis*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus Pyogenes*, *Bacillus Anthracis*, *Clostridium Tetani*, *C. Welchii*, dont la croissance est inhibée par des dilutions supérieures à 10^{-6}.

— Des espèces moins sensibles comme *C. Diphteriæ* (dilution limite 10^{-5}) ou presque insensibles comme *Brucella Melitensis*, *Klebsiella Pneumoniæ*, *Pseudomonas Æruginosa*, dont les cultures sont possibes en présence d'une concentration antibiotique de l'ordre de 10^{-3}.

Ces derniers microorganismes peuvent être inhibés *in vitro* par des doses relativement élevées de pénicilline mais les infections qu'ils provoquent chez l'animal inoculé ou chez l'homme malade ne sont pas influencées par la pénicillinothérapie. On leur donne généralement, pour cette raison, le nom d'*espèces pénicillino-résistantes*.

Nous empruntons à Fleming le tableau XVIII qui classe les microorganismes suivant leur sensibilité ou leur insensibilité à l'antibiotique.

2° D'autre part, au sein d'une espèce bactérienne déterminée et classée par exemple comme pénicillino-sensible, on sait depuis longtemps qu'il est possible de rencontrer des *variétés* ou des *souches* qui ne seront pas inhibées par

TABLEAU XVIII

Sensibilité des microorganismes à la pénicilline

SENSIBLES	INSENSIBLES
Staphylocoques. **Streptococcus Pyogenes.** **Streptococcus Viridans.** Quelq. streptocoques anaérobies. Pneumocoques. Méningocoques. **Neisseria Catarhalis.** Microcoques. Sarcines. Actinomycètes. **Bacillus Anthracis.** Anthracomorphes **(Bacillus Subtilis).** Groupe diphtérique. Clostridies **(Tetani, Welchii, Septique, Botulinum,** etc... **Streptobacillus Moniliformis.** **Erysipelothrix rhusiopathiae.** **Spirillum Minus.** Spirochetes de la Fièvre récurrente, Angine de Vincent, Maladie de Weil. Certains virus de grande taille (Psittaccose, Ornithose). Certaines Rikettsies.	Entérocoques **(Streptoc. Faecalis).** Cocci Gram. — Négatifs non pathogènes. Groupe Coli-Typhique-Dysentérique : **Vibrio Cholerae.** **Proteus..** Groupe Pseudomonas **(Ps. Aeruginosa, B. Fluorescens.)** Groupe Hemophilus **(H. Influenzae, H. Pertussis).** Groupe Acidorésistant (Tuberculeux, Lépreux). Groupe Pasteurella (P. Pestis, etc.). **Klebsiella Pneumoniae.** La plupart des virus. Les levures. Les moisissures.

(D'après FLEMING.)

des concentrations plus élevées de l'antiobiotique. C'est le cas, par exemple, pour des staphylocoques, des streptocoques. On applique encore à ces faits le terme de *Pénicillino-résistance* et on s'attache à différencier :

La *pénicillino-résistance acquise,* insensibilité relative présentée par une souche primitivement sensible à la suite d'un contact prolongé avec l'antibiotique,

Et la *pénicillino-résistance naturelle* qui paraît un caractère absolument indépendant de toute exposition préalable à l'action antibactérienne.

Dans le but d'étudier le rôle de la Pénicillinase dans la susceptibilité bactérienne à la pénicilline, nous sommes obli-

gés de conserver cette distinction et d'envisager successivement :

— La sensibilité ou l'insensibilité des espèces bactériennes;

— La résistance acquise ou naturellle des souches provenant d'espèces habituellement pénicillino-sensibles.

PÉNICILLINASE ET PÉNICILLINO-SENSIBILITÉ DES ESPÈCES BACTÉRIENNES

Cette première question ne nous arrêtera pas longtemps puisqu'il suffit, pour en avoir une idée, de comparer les deux tableaux de Fleming (p. 106) et de Bondi et Dietz (p. 103).

On voit tout de suite que les bacilles Gram négatifs insensibles à la pénicilline, comprennent de nombreux groupes ou espèces produisant de la Pénicillinase : *E. Coli, B. Para-Coli, A. Aerogenes, Shigella Dysenteriæ*, etc., mais on ne trouve parmi les *Salmonella*, les *Brucella* aucune souche capable d'élaborer le principe antipénicilline.

D'autre part, les cocci hautement pénicillino-sensibles ne produisent pas de Pénicillinase alors qu'un bacille très sensible comme *B. Anthracis* possède un enzyme très actif.

Si donc les germes produisant de la Pénicillinase ne sont pas, en général, hautement sensibles à la pénicilline, cette règle n'a pas une valeur absolue. On peut conclure avec Abraham et Chain (1) que l'*aptitude d'une espèce bactérienne à produire de la Pénicillinase n'est probablement pas le seul facteur à considérer pour déterminer sa susceptibilité à l'égard de la pénicilline.*

En est-il de même pour les souches pénicillino-résistantes appartenant à une espèce en général sensible?

PÉNICILLINASE ET PÉNICILLINO-RÉSISTANCE D'UNE SOUCHE APPARTENANT A UN GENRE OU UNE ESPÈCE SENSIBLE

Cette deuxième question nous paraît mériter une étude un peu plus approfondie.

— D'une part, en raison de la fréquence croissante de telles souches;

— D'autre part, par analogie avec ce que l'on sait du mécanisme de la sulfamido-résistance.

La possibilité de l'acquisition par les germes d'une sulfamido-résistance *in vitro* est, en effet, admise aujourd'hui par tous les auteurs. Dans le cas de *Staphylococcus aureus*, cette résistance paraît en rapport avec une synthèse accrue d'*acide para-amino-benzoïque*. Or, ce n'est pas ce mécanisme qui intervient dans la *Pénicillino-résistance*. Nous avons dit que le facteur antisulfamide n'était nullement antagoniste de la pénicilline mais, au contraire, qu'il pouvait même avoir une action synergique. D'ailleurs, Spink et ses collaborateurs (118) ont montré que des souches de staphylocoques et de pneumocoques rendues sulfamido-résistantes ont conservé leur pénicillino-sensibilité originelle.

La Pénicillinase va-t-elle jouer dans le mécanisme de la pénicillino-résistance acquise un rôle comparable à celui de l'acide para-amino-benzoïque dans le déterminisme de la sulfamido-résistance?

Cette question de la pénicillino-résistance acquise préoccupe de plus en plus les bactériologistes; elle se pose différemment suivant les germes; nous allons donc, nous limitant à quelques espèces pathogènes, passer en revue les travaux des auteurs sur cette question.

STAPHYLOCOQUES

C'est certainement pour les staphylocoques que le problème de la pénicillino-résistance acquise et partant celui de l'avenir de la pénicillinothérapie se pose avec le plus d'acuité. C'est, en tous cas, ce genre bactérien qui a suscité les travaux les plus nombreux.

Pénicillino-résistance naturelle

Fleming rapporte avoir rencontré exceptionnellement des souches de staphylocoques « presque insensibles » à la pénicilline.

Kirby (71) démontre que 1 milligramme d'une poudre fabriquée à partir d'une souche pénicillino-résistante de *Staphylococcus Aureus* détruit, en un temps très court, 100 U. de pénicilline. Expérimentant sur sept souches naturellement résistantes, il obtient dans tous les cas une poudre bactérienne très active qu'il utilise pour détruire la pénicilline dans les hémocultures ou dans les cultures provenant de malades soumis à la pénicillinothérapie.

Pénicillino-résistance acquise « in vitro »

Dès 1940, Abrham et Chain (1) ont réussi à rendre une souche de *Staphylococcus Aureus* mille fois plus résistante à la pénicilline que la souche initiale en la repiquant dans du bouillon contenant des quantités croissantes de l'antibiotique. Ces auteurs précisent que *cette pénicillino-résistance acquise « in vitro » ne s'accompagne pas de l'élaboration d'une Pénicillinase.*

Mac Kee et Houck (85) réalisent également par repiquage en présence de concentrations croissantes une pénicillino-résistance acquise.

Sur trois souches étudiées, deux après vingt-huit passages résistent à des concentrations respectivement mille et quatre mille fois supérieures à celle qui inhibe le témoin; la troisième, après soixante passages, atteint un taux six mille fois plus élevé. Mais ces trois souches ont perdu presque complètement leur virulence pour la souris : à l'origine, elles la tuent à la dilution 10^{-7}; il faut maintenant une dilution inférieure à 10^{-1}. Cette perte de virulence paraît durable; elle persiste après neuf passages en série à la souris et trente-deux repiquages successifs. Dans ces conditions, la pénicillino-résistance aussi paraît stable.

Par contre, les caractères bactériologiques se sont modifiés : la croissance est plus lente, la morphologie atypique, mais les réactions biochimiques sont inchangées.

Remarquons que ces souches devenues hautement péni-

cillino-résistantes *in vitro* gardent la même sensibilité que le témoin en face des sulfamides ou des antibiotiques d'origine végétale.

Spink et ses collaborateurs (118) confirment ces résultats mais précisent qu'inversement des germes rendus sulfamido-résistants conservent leur pénicillino-sensibilité initiale. La sulfamido-résistance est plus rapidement acquise que la pénicillino-résistance; elle en semble absolument indépendante. De plus, alors que les souches sulfamido-résistantes ne sont pas plus sensibles que la souche originelle à l'action bactéricide du sang total, ces auteurs notent que les staphylocoques devenus artificiellement résistants deviennent plus sensibles à cette action bactéricide, donc vraisemblablement aux autres mécanismes de défense de l'organisme.

Pénicillino-résistance acquise « in vivo »

La possibilité du développement d'une pénicillino-résistance acquise du staphylocoque *in vivo* a été contestée par de nombreux auteurs. Dowling et ses collaborateurs (34) rapportent une observation qui nous paraît très démonstrative.

Il s'agit d'une endocardite bactérienne subaiguë à staphylocoques, traitée par la pénicilline. Une première hémoculture, pratiquée le quinzième jour de la maladie, met en évidence un *Staphylococcus Aureus* inhibé par des concentrations de 0,01 U.O./c.c. de pénicilline X et 0,04 U.O./c.c. de pénicilline G. Le malade reçoit 15.000 U.O. par voie intramusculaire toutes les 3 heures. Le 29e jour, le germe retiré de l'hémoculture est à nouveau testé, sa résistance à la pénicilline a doublé : 0,02 U.O./c.c. de pénicilline X et 0,09 U.O./c.c. de pénicilline G; 10 jours plus tard : 0,09 U.O./c.c. de pénicilline X et 0,2 U.O./c.c. de pénicilline G; le 41e jour, les taux inhibiteurs se sont respectivement élevés à 0,2 et 0,4 U.O./c.c., soit 20 et 10 fois plus élevés qu'au début du traitement. Devant ces chiffres, la dose journalière de pénicilline est portée à 1.000.000 U.O. et l'évolution se fait vers la guérison.

Rammelkamp et Maxon (108) ont isolé chez quatre malades des souches de *Staphylococcus Aureus* devenues résis-

tantes après traitement (P.S. = 0,35 à 285 U.O./c.c.). Ils ne précisent pas l'aptitude de ces souches à produire de la Pénicillinase.

Spink et Ferris (117) étudiant sept souches de staphylocoques pénicillino-résistantes isolées chez des malades rapportent que cinq d'entre elles sont devenues résistantes dans l'organisme à la suite de la pénicillinothérapie puisque les germes isolés des mêmes lésions avant le traitement étaient sensibles à la pénicilline. *Toutes ces souches produisent un puissant pénicillino-inhibiteur très comparable à la Pénicillinase.*

Mary Barber (5) (6), dans deux importantes publications, rend compte de l'étude systématique de la sensibilité à la pénicilline des souches de staphylocoques isolées chez les malades d'un même hôpital au cours de deux périodes distinctes. Cet auteur rapporte les résultats suivants :

— D'avril à novembre 1946, sur 200 souches de staphylocoques isolées, 25 (soit 12,5 %) sont pénicillino-résistantes.

— De février à juin 1947, sur les 100 souches 38 (soit 38 %) sont résistantes.

Sur les 25 souches résistantes isolées en 1946, on a mis en évidence la présence de souches pénicillino-résistantes et pénicillino-sensibles six fois chez le même malade et quatre fois dans un même échantillon. Parmi ces vingt-cinq malades, cinq ont reçu de la pénicilline avant le prélèvement, deux en cours de traitement.

Ces 25 souches résistantes produisent toutes une anti-pénicilline alors que 12 souches sensibles étudiées en comparaison ne produisent aucune diminution de l'activité de la pénicilline. De même les souches qui ont acquis la résistance *in vitro* par repiquage en série ne produisent aucune Pénicillinase.

Toutes les souches résistantes présentent une sensibilité variable au sulfathiazol et une sensibilité à la streptomycine égale à celle de la souche inoculée. Il n'y a aucune différence dans les caractères biochimiques et la morphologie des colonies entre les souches sensibles et résistantes. Enfin, cette pénicillino-résistance paraît un caractère durable; elle persiste, inchangée, au bout de neuf mois.

Les 38 souches résistantes isolées en 1947 par le même auteur dans les mêmes conditions représentent un pourcentage beaucoup plus élevé (38 % au lieu de 12,5 %). Il semble évident que cette augmentation de fréquence est en rapport avec l'extension de la pénicillinothérapie; cependant, sur ces trente-huit malades, huit n'avaient jamais reçu de pénicilline avant le prélèvement.

Parmi les résultats personnels que nous rapportons à propos de l'utilisation de la Pénicillinase en bactériologie clinique, nous avons relevé, à six reprises, l'intervention de staphylocoques. Chez trois malades au moins, il s'agit de souches pénicillino-résistantes (Observations VII, XII, XVIII).

Seule l'observation VII est intéressante à analyser car on a pu pratiquer dix-neuf examens successifs au cours de la pénicillinothérapie et quatre déterminations de la pénicillino-sensibilité du *Staphylococcus Aureus* en cause.

Bien que nous n'ayons pas pu effectuer d'examen bactériologique avant l'administration de l'antibiotique et que nous ignorions par conséquent la susceptibilité originelle à la pénicilline de la souche bactérienne en cause, il y a toutes raisons de penser qu'il s'agit d'une pénicillino-résistance naturelle. Les examens répétés montrent, de plus, qu'il ne se produit, au cours de la pénicillinothérapie prolongée aucune augmentation du taux de la résistance de ce germe :

Pénicillino-sensibilité : 12,5 U.O. pén. Ayerst le 24-6-47.
— 10 U.O. spénicilline G le 1-7-47.
— 10 U.O. spénicilline G le 15-7-47.
— 10 U.O. spénicilline G le 4-8-47.

Nous avons recherché si cette souche produit une Pénicillinase extra-cellulaire. Adoptant une technique identique à celle utilisée pour la Pénicillinase-Subtilis, nous avons réalisé des cultures en bouillon glucosé et en bouillon ordinaire, après quatre jours d'incubation à 37°, on neutralise et on filtre sur bougie Chamberland L^3. L'activité antipénicilline du filtrat est appréciée par la méthode des dilutions en série en milieu glucose-P.S.P. de B. Sureau ensemencé avec le *Staphylococcus Aureus H.* Les résultats obtenus sur une moyenne de trois tests pratiqués dans des conditions identiques sont rapportés sur le tableau XIX.

TABLEAU XIX

Activité antipéniciline du filtrat du Staphylococcus Aureus C. 1060 éprouvée en milieu de SUREAU ensemencé par le St. Aureus H

PENICILLINE U. O /c c.	TAUX MINIMUM DE FILTRAT INHIBITEUR					
	18 h.	24 h.	36 h.	48 h.	72 h.	96 h.
100	1/2	1/4	1/4	1/4	1/8	1/16
10	1/4	1/8	1/8	1/16	1/32	1/64
1	1/10	1/20	1/20	1/40	1/80	1/80

(1) Spécilline G, N° 1.302, exp. : déc. 1950, 1.600 U/mg.

Les résultats obtenus avec des préparations faites en bouillon ordinaire ou en bouillon glucosé sont à peu près superposables.

Il ne saurait être question d'invoquer ici une destruction de la pénicilline par le milieu ou le séjour à l'étuve puisque des tubes contenant des quantités moindres du filtrat éprouvé et les témoins qui ne contiennent que la pénicilline dans le bouillon ensemencé restent stériles.

Il faut donc admettre l'existence d'une activité antipénicilline faible mais certaine du filtrat de culture en bouillon du « Staphylococcus Aureus C. 1060 » pénicillino-résistant.

STREPTOCOQUES

Pénicillino-résistance naturelle.

L'existence de souches de streptocoques naturellement résistantes à la pénicilline ne fait aucun doute.

Watson (126) étudiant la sensibilité à la pénicilline de souches appartenant à différents groupes sérologiques de Lancefield conclut :

— Les souches d'un même groupe présentent un même degré de pénicillino-sensibilité.

A l'exception du groupe D, toutes sont sensibles; celles du groupe A, qui comprend la grosse majorité des streptocoques pathogènes pour l'homme sont complètement inhibées par une concentration de 0.0156 U.O./c.c.

Par contre, celles du groupe D, plus résistantes, exigent 2 à 5 U.O./c.c. *Mais aucune des souches de ce groupe étudiées ne produit de Pénicillinase* ni après extraction bactérienne par l'acétone-ether, ni après filtration du liquide de culture.

Pénicillino-résistance acquise « in vitro ».

Elle a été réalisée par Mac Kee et Houck (85) par repiquage en série, mais ces auteurs n'ont pas dépassé un taux supérieur à trente fois celui du témoin. Ils notent une perte complète de la virulence du variant résistant.

Pénicillino-résistance acquise « in vivo ».

Une observation complète de Dowling, Hirsh et O'Neil (34) en montre la possibilité.

Chez un sujet atteint d'endocardite bactérienne subaiguë à streptocoques on pratique tous les jours une hémoculture, quelle que soit la température du malade et la thérapeutique administrée.

Après 6 hémocultures consécutives ayant mis en évidence un *Streptococcus Viridans*, le malade reçoit 800.000 U.O. par voie buccale, le 1er jour, 1.600.000 le 2e; le tableau clinique n'étant pas modifié, on pratique une injection de pénicilline G toutes les deux heures, pendant 40 jours.

Une hémoculture pratiquée le 16e jour met en évidence un streptocoque sensible à 0,007 U.O./c.c. de pénicilline G ou X. Après une semaine d'apyrexie où toutes les hémocultures sont négatives, la fièvre se rallume, l'hémoculture pratiquée le 40e jour donne les taux de pénicillinosensibilité suivants : 0,01 U.O. de pénicilline X et 0,04 U.O. de pénicilline G. On essaye alors la pénicilline X, à raison de 500.000 U.O. par jour en perfusion intramusculaire. Le 50e jour, les taux sont devenus : 0,04 U.O./c.c. pénicilline X et 0,18 U.O. pénicilline G. On est obligé de remplacer par la pénicilline G à la même dose. Le 55e jour,

on a 1,4 U.O./c.c. pénicilline X et 1,4 U.O./c.c. pénicilline G. On passe alors à 1.000.000 U.O. de pénicilline G par jour en perfusion intramusculaire; on obtient alors l'apyrexie puis la guérison clinique apparente avec un recul de 6 mois.

Les auteurs soulignent qu'à l'exception des deux premiers jours, où on a utilisé la voie buccale, le taux de pénicillinémie réalisé a toujours été supérieur à celui nécessaire pour inhiber la croissance du germe *in vitro*. Et pourtant l'infection est restée active jusqu'à ce que l'on se décide à atteindre la dose quotidienne de un million d'unités.

PNEUMOCOQUES

Les seuls faits rapportés ont trait à la *résistance acquise « in vitro »*.

Mac Kee et Houck (85) étudient trois souches de pneumocoques de types I, II et III. Après cinquante à soixante passages en série sur bouillon pénicilliné, le taux maximum de pénicillino-résistance obtenu est trente fois supérieur à celui du témoin pour le pneumocoque du type II, soixante fois pour les types I et III. Tous trois présentent une nette diminution de leur virulence. C'est là un caractère stable qui persiste inchangé après neuf passages sur l'animal et trente-deux repiquages en série.

Par contre, Eriksen (40) étudiant dix souches de pneumocoques par passage quotidien sur un milieu au sérum pénicilliné rend huit souches résistantes. Inoculées aux souris, celles-ci manifestent une virulence intacte.

MENINGOCOQUES

P. Miller et Bohnoff (89) ont étudié la *pénicillino-résistance acquise* des méningocoques. Ils ont montré qu'il était possible, *in vitro*, par repiquages répétés des germes sur des milieux solides additionnés de pénicilline de porter artificiellement le taux de pénicilline limite au chiffre considérable de 65 U.O./c.c. permettant la pousse. Ces auteurs notent qu'*aucune de ces souches rendue pénicillino-résistante ne se montre productrice de Pénicillinase.*

Poursuivant des recherches analogues *in vivo*, ils ont inoculé des souris avec des suspensions microbiennes; ces animaux ont été soumis à la pénicillinothérapie. Les cultures obtenues par ponction du cœur chez les animaux décédés de l'infection ou tués en cours de maladie et ensemencement sur des milieux dépourvus de pénicilline sont utilisées pour inoculer un nouveau lot. Ces passages répétés en série conduisent aux résultats suivants : en début d'expérience, 20 à 40 U.O. de pénicilline suffisent pour traiter une souris infectée par environ 10^8 méningocoques. Après vingt-cinq passages sur des souris traitées par la drogue, la souche a une pénicillino-résistance suffisante pour produire une infection généralisée avec hémoculture positive qui aboutit régulièrement à la mort malgré des doses allant jusqu'à 1400 U. de pénicilline. Là aussi *aucune Pénicillinase n'a pu être mise en évidence à partir de cette souche.*

GONOCOQUES

« Si loin que l'on aille, écrit l'auteur anonyme de la revue générale sur la pénicillino-résistance publiée dans le *British Medical Journal* (3), on ne peut démontrer de façon incontestable que le gonocoque puisse devenir sérieusement pénicillino-résistant. Il y a cependant quelque chose d'alarmant à lire C. Huriez et Desurmont (69) qui croient avoir observé les débuts de la pénicillino-résistance dans le cadre des gonococcies. »

Remarquons que le concept pénicillino-résistance tel que nous avons essayé de le définir et de l'analyser est un terme purement biologique qui ne peut être basé que sur une identification bactériologique précise et un test de pénicillino-sensibilité pratiqué de façon rigoureuse. L'échec de la pénicillinothérapie s'explique incontestablement, dans certains cas, par l'insensibilité du germe à l'égard de l'antiobiotique aux doses thérapeutiques; mais il est des cas où cette pénicillino-résistance n'est qu'accessoire et où, même en présence d'un germe sensible on peut enregistrer un échec partiel du traitement : c'est le cas notamment lorsque l'antibotique n'arrive pas à une concentration suffisante au au contact de l'agent microbien.

Nous en avons recueilli de nombreux exemples dans le service de notre maître le Professeur Tapie : pleurésies purulentes localisées, abcès du poumon enkystés, méningites cloisonnées, etc.

La forme clinique d'individualisation récente d'endocardite maligne subaiguë à hémoculture négative, sur la gravité de laquelle insistent les cardiologues, paraît entrer dans ce cadre.

III. — Pénicillinase et Pénicillino-Résistance : Conclusions et conséquences pratiques

Une des principales raisons pour lesquelles la pénicillinothérapie doit s'aider aussi vite que possible du contrôle du laboratoire est que la sensibilité à la pénicilline varie non seulement parmi les espèces bactériennes mais aussi quelquefois suivant les souches d'une même espèce.

Quand une souche présente une résistance anormale, celle-ci peut être naturelle ou acquise.

L'aptitude des différentes souches à présenter une pénicillino-résistance acquise paraît très variable. On ne rencontre, heureusement, pratiquement jamais de souches de *Streptococcus pyogenes* du groupe A résistantes et par les moyens habituels ce germe ne peut, *in vitro*, acquérir la Pénicillino-résistance qu'à un degré assez faible.

Par contre, les souches résistantes de *Staphylococcus Aureus* sont fréquemment rencontrées et dans une proportion qui paraît croissante, *in vitro*, la résistance peut être accrue dans des limites considérables.

L'intérêt des Staphylocoques est que la résistance présentée *in vivo* et *in vitro* paraît différente.

— La première, *in vivo*, ne s'accompagne d'aucun changement dans les caractères culturaux; elle est permanente et paraît en rapport avec la *production de Pénicillinase*.

— La deuxième, *in vitro*, s'accompagne d'un changement du type des colonies; elle se perd par repiquage sur

milieu normal et *n'est pas en rapport avec la production de Pénicillinase.*

La raison pour laquelle deux mécanismes manifestement distincts s'exercent dans des conditions différentes pour produire le même résultat est encore inconnue. On ne saurait affirmer si le processus en cause est une *sélection* ou une *adaptation.*

Eriksen (40) se basant sur la proportion de colonies anormales trouvées sur les boîtes pendant l'accoutumance à la pénicilline opte pour la première hypothèse.

Abraham et ses collaborateurs de l'Ecole d'Oxford soutiennent, par contre, la théorie qu'une sélection est la base d'une résistance acquise aux antibiotiques en général. Ils étudient trois antibiotiques et constatent qu'après accoutumance à l'un d'eux le *Staphylococcus Aureus* s'adapte de la même façon à un autre, ce qui est invraisemblable si le premier processus a tout éliminé, sauf les descendants du petit nombre de germes résistants.

Mary Barber (6), à la suite de l'enquête précise que nous avons déjà citée, adopte le même point de vue :

Les staphylocoques pénicillino-résistants rencontrés ne proviennent pas de souches pénicillino-sensibles ayant acquis la résistance par suite d'un contact préalable avec l'antibiotique mais ce sont des souches naturellement résistantes qui apparaissent par suite d'un simple processus de sélection dans les infections traitées par la pénicilline.

Une question très importante au point de vue pratique se pose : D'où viennent ces germes pénicillino-résistants rencontrés chez les malades?

Origine des souches pénicillino-résistantes.

Norta et Christie, en 1946, ont étuudié cette question dans un service de chirurgie plastique; ils rencontrent de nombreuses souches résistantes de *Staphylococcus Aureus;* des prélèvements effectués à intervalles réguliers permettent des examens biochimiques, sérologiques et des tests de pénicillino-sensibilité. Ils déclarent n'avoir jamais rencontré de souches pénicillino-résistantes avant traitement et n'avoir jamais obtenu un mélange de colonies sensibles et résistantes. Ils se rallient donc plutôt à l'hypothèse de l'adapta-

tion; pour eux *la stimulation par la pénicilline changerait des staphylocoques possédant en puissance la propriété de produire de la Pénicillinase en variants produisant réellement de la Pénicillinase.*

Mary Barber (6), s'appuyant sur des résultats opposés, estime que dans quelques cas les germes pénicillino-résistants sont initialement présents au niveau de la lésion mais que, dominés par le développement des souches sensibles. ils ne deviennent prédominants que lorsque l'antibiotique provoquant la disparition des autres laisse le champ libre à leur multiplication.

De plus, elle insiste sur le fait que les surinfections d'hôpital par la *Staphylococcus pyogenes* sont banales et que de nombreux auteurs ont montré que les staphylocoques pénicillino-résistants apparaissent plus souvent chez les malades hospitalisés depuis longtemps que chez ceux admis récemment. Dans tout hôpital utilisant de grandes quantités de pénicilline (et quel est celui qui n'en fait pas autant actuellement?) les germes résistants augmentent probablement aux dépens de ceux qui sont sensibles, et il n'est pas illogique de penser que dans quelques temps les germes résistants seuls subsisteront.

Une souche de staphylocoque pénicillino-résistante, une fois installée dans un service ou une salle d'hôpital, risque de s'étendre de malade à malade. Mary Barber a bien mis en évidence ce fait en comparant le taux des souches résistantes isolées dans l'hôpital entier à celui plus élevé isolé dans un service déterminé de cet hôpital. Des identifications par les phages spécifiques et les réactions sérologiques pratiquées sur cinq souches résistantes et deux sensibles isolées de ce service au cours du même mois, montrent que les cinq résistantes appartiennent à un même type et les deux sensibles à un type différent du premier.

Mécanisme de la pénicillino-résistance acquise.

En dehors du cas particulier des staphylocoques résistants naturellement ou par suite d'un contact avec l'antibiotique dans l'organisme, la notion de pénicillinase n'éclaire nullement le problème général de l'acquisition de la pénicillino-résistance par les bactéries.

Bondi et Dietz (16) font remarquer qu'il n'y a là rien d'étonnant puisque l'inaptitude à produire de la Pénicillinase ne paraît pas un facteur déterminant dans la sensibilité d'une espèce microbienne à la pénicilline, les facteurs mis en jeu dans l'acquisition de la pénicillino-résistance doivent être liés à ceux qui déterminent la pénicillino-sensibilité naturelle de l'espèce bactérienne.

Or, nos connnaissances dans ce domaine sont encore bien fragmentaires :

Gale (43) a montré, à propos des staphylocoques, qu'il existe une relation entre le processus d'assimilation de l'*acide glutamique* et la pénicillino-sensibilité des germes. Plus les germes deviennent résistants, moins actifs sont leurs processus d'assimilation. Ces variations démontrées pour l'acide glutamique peuvent être symptomatiques d'un changement général dans leurs propriétés d'assimilation des germes. Il est possible que si la pénicillino-résistance était poussée plus loin encore les germes présenteraient un changement de caractère de leur métabolisme pour pouvoir continuer à pousser. Un tel changement a été signalé par Bellamy et Klimek (10). Ces auteurs, reprenant la constatation déjà ancienne que les staphylocoques pénicillino-résistants poussent plus lentement que la souche initiale notent que les variants devenus hautement résistants poussent presque exclusivement à la surface du bouillon de culture, que la perte de l'anaérobiose est une cause possible du ralentissement de la pousse. En corollaire, les germes qui ne peuvent pas pousser en anaérobiose devraient développer une faible résistance à la pénicilline. Ceci expliquerait l'échec de Mac Kee et Houck (85) pour obtenir une augmentation de résistance supérieure à trente fois pour le pneumocoque et le streptocoque, augmentation relativement faible à côté des mille et six mille fois obtenus couramment pour le staphylocoque. La pénicilline semble donc interférer avec au moins un des facteurs essentiels dans le métabolisme anaérobie des germes sensibles.

D'ailleurs, des souches de *Streptococcus Fœcalis*, *Streptococcus Mastitidis* et *Clostridium Welchii* traitées de la même façon ne présentent pas de résistance acquise à la pénicilline. Ils suggèrent que *les germes qui dépendent de pro-*

cessus anaérobies pour leur énergie n'acquièrent pas de résistance appréciable à la pénicilline.

La perspective de voir croître rapidement la proportion des souches résistantes au sein d'espèces sensibles — staphylocoques, par exemple — nous conduit à souligner encore la *nécessité impérieuse d'un contrôle bactériologique rigoureux de la pénicillinothérapie*. Il faut insister notamment sur l'obligation de déterminer, toutes les fois que c'est possible, de préférence avant le début du traitement, la sensibilité à la pénicilline du germe en cause, mais aussi, à plusieurs reprises au cours de l'évolution. C'est la seule façon logique de pouvoir adapter la posologie en modifiant les doses ou les voies d'administration du médicament et, au besoin même de changer d'agent antimicrobien. Cette règle nous paraît dépasser d'ailleurs le cadre de la pénicillinothérapie pour dominer celui de toute la thérapeutique anti-infectieuse par les antibiotiques.

Le rôle joué par la Pénicillinase dans la pénicillino-résistance nous paraît assez limité et cependant cette notion nous amène à reconsidérer ces deux points pratiques essentiels :

1° La détermination de la sensibilité d'un germe à la pénicilline;

2° La sensibilité d'un germe pénicillino-résistant aux autres agents antimicrobiens.

DETERMINATION DE LA PENICILLINO-SENSIBILITE D'UN GERME

Nous ne reviendrons pas sur la description des différentes méthodes aujourd'hui classiques, remarquablement détaillées dans l'ouvrage de Brocu (21) et que nous avons nous-même exposées dans une revue générale antérieure (91).

Nous nous limiterons au test classique par dilution que nous utilisons couramment. Il consiste à ensemencer une série de tubes de milieu ordinaire (eau peptonée, bouillon) ou additionné d'un sucre et d'un indicateur de pH (milieu Glucose-P.S.P. de Sureau, par exemple) présentant des taux décroissants de pénicilline, avec une quantité grossièrement égale des germes étudiés.

Les méthodes proposées par les auteurs varient légèrement en ce qui concerne l'importance de l'ensemencement, réalisé, en général, à partir d'une dilution variable (10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}) d'une culture de dix-huit à vingt-quatre heures du germe en milieu liquide.

On admet classiquement que ces différences sont sans importance et les résultats comparables car, comme l'ont montré les chercheurs de l'Ecole d'Oxford, l'action de la pénicilline, est dans une large mesure, indépendante du nombre de germes en présence et fonction uniquement de la concentration de l'antibiotique.

Or, cette règle est incontestablement exacte en ce qui concerne les germes pénicillino-sensibles. Mais pour les germes résistants, Barber et Uria (5) ont montré qu'il n'en est pas toujours ainsi. Un léger ensemencement peut montrer une sensibilité élevée tandis qu'un ensemencement plus important poussera en présence d'une concentration très supérieure de l'antibiotique.

Ainsi Barnes (7), étudiant l'action de la Pénicilline sur *B. Anthracis*, constate que sa sensibilité varie dans une proportion très importante avec l'importance de l'ensemencement :

Des concentrations de spores de 10^7 et 10^8 poussent en 24 h. en présence de 10 U.O./c.c., alors que celle de 10^6 est inhibée par 2 U.O. et 10^5 par 0,5 U.O./c.c.

De plus, cet auteur démontre que le liquide de culture surnageant contient un *principe thermolabile, non dialysable : la Pénicillinase.*

Eriksen (39) arrive à la même conclusion. Il explique le fait que ce germe producteur de la Pénicillinase présente une pénicillino-sensibilité parfois considérable, mais variable avec l'ensemencement, par analogie avec ce que l'on a démontré pour les sulfamides, où la dépendance de leur actions vis-à-vis du nombre de germes en présence est certainement en rapport avec le contenu des germes en antisulfamides. Il est logique de penser ici que l'élaboration d'une Pénicillinase peut jouer un rôle analogue dans la pénicillino-sensibilité.

Nous avons personnellement, dès le début de notre travail expérimental, cherché à préciser la sensibilité à la

Pénicilline des souches que nous utilisons pour la production de Pénicillinase. N'ayant pas encore eu connaissance des faits rapportés par les auteurs étrangers, nous avons d'abord été troublés devant les résultats très variables que nous obtenions. Précisant le rôle possible du milieu, son volume, sa composition, de la durée d'incubation et de l'importance de l'ensemencement, nous avons constaté les faits suivants :

1° *Rôle du milieu :* les milieux riches (bouillon de viande, bouillon glucosé, bouillon au sang) permettent une croissance plus rapide et, en présence de concentrations plus élevées de pénicilline;

2° *Rôle de l'ensemencement :* plus l'ensemencement est important, plus la croissance bactérienne est rapide en présence de taux antibiotiques importants;

3° *Rôle du temps d'incubation :* les résultats ne diffèrent guère entre 18 et 24 h., comme dans presque tous les titrages par la méthode de dilution, mais ils varient de façon considérable les jours suivants, avec la prolongation du séjour à l'étuve et des tubes considérés comme stériles poussent tardivement sans le secours d'un réensemencement.

Nous rapportons sur les tableaux XX et XXI des résultats typiques à cet égard. Les chiffres donnés représentent la moyenne de trois tests dans des conditions superposables.

Les germes étudiés sont :

— le *Staphylococcus Aureus* « *H Londres* », germe test pénicillino-sensible;

— le *B. Subtilis* « *Byline* » et le *B. Subtilis* « *Ungar* », souches utilisées pour la production de Pénicillinase;

— le *Staphylococcus Aureus* « *C 1090* », naturellement pénicillino-résistant et vraisemblablement producteur d'une Pénicillinase.

— le *Streptococcus Proteiformis* « *M 317* », souche appartenant à une variété relativement insensible à la pénicilline et chez lequel nous n'avons pu mettre en évidence la propriété d'élaborer une Pénicillinase extra-cellulaire.

TABLEAU XX

Action comparée de la pénicilline sur les B. Subtilis « Byline » et « Ungar », les Staphylococcus Aureus « H. Londres » et « C. 1060 », le Streptococcus Proteiformis « M. 317 »

Ensemencements comparables en eau peptonée

PENICILLINE U. O./cc.	1000	100	10	1	0,1	0,01	0
B. Subtilis « Byline »							
18 h.	0	0	0	0	0	+	+
24 h.	0	0	0	0	0	++	++
48 h.	0	0	0	0	+	+++	+++
72 h.	0	0	0	+	+++	+++	+++
96 h.	0	+	++	++	+++	+++	+++
120 h.	0	++	+++	+++	+++	+++	+++
144 h.	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
168 h.	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
B. Subtilis « Ungar »							
18 h.	0	0	0	0	0	+	+
24 h.	0	0	0	0	0	++	++
48 h.	0	0	0	0	++	+++	+++
72 h.	0	0	+	+	+++	+++	+++
96 h.	0	++	++	++	+++	+++	+++
120 h.	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
144 h.	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
168 h.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
St. Aureus « Londres »							
18 h.	0	0	0	0	0	+	+
24 h.	0	0	0	0	0	++	++
48 h.	0	0	0	0	0	+++	+++
72 h.	0	0	0	0	0	+++	+++
96 h.	0	0	0	0	0	+++	+++
120 h.	0	0	0	0	0	+++	+++
144 h.	0	0	0	0	0	+++	+++
168 h.	0	0	0	0	0	+++	+++
St. Aureus « C. 1060 »							
18 h.	0	0	0	+	+	+	+
24 h.	0	0	0	+	++	++	++
48 h.	0	0	+	++	+++	+++	+++
72 h.	0	0	++	++	+++	+++	+++
96 h.	0	0	++	+++	+++	+++	+++
120 h.	0	+	+++	+++	+++	+++	+++
144 h.	0	+	+++	+++	+++	+++	+++
168 h.	0	++	+++	+++	+++	+++	+++
St. Protéiformis « M 317 »							
18 h.	0	0	0	+	+	+	+
24 h.	0	0	0	+	++	++	++
48 h.	0	0	0	++	+++	+++	+++
72 h.	0	0	0	++	+++	+++	+++
96 h.	0	0	0	+++	+++	+++	+++
120 h.	0	0	0	+++	+++	+++	+++
144 h.	0	0	0	+++	+++	+++	+++
168 h.	0	0	0	+++	+++	+++	+++

Spécilline « G », Lot 1.301. Exp. : déc. 1950, 1.600 U/mg.

Eau peptonée Difco pH7. Ensemencement : 0,1 cc. culture en bouillon de 18 h. pour 10 cc. de milieu.

\+ Croissance minime (léger trouble).

\+ + Croissance notable (trouble, début du voile si subtilis).

\+ + + Croissance complète (trouble et dépôt, voilé net si subtilis).

TABLEAU XXI

Action comparée de la pénicilline sur B. Subtilis « Byline » et « Ungar », Staphylococcus Aureus « H. Londres » et « C. 1060 », Streptococcus Proteiformis « M. 317 »

Ensemencements variables sur milieu Glucose P.S.P. de SUREAU

Résultats résumés :

Concentration minimum de pénicilline (U.O./c.c.) inhibant la pousse

TEMPS D'INCUBATION	18	24	48	72	96	120
B. Subtilis « Byline »						
10^{-1}	312	625	625	1250	1250	1250
10^{-2}	2 5	5	10	40	160	160
10^{-3}	0,16	0,32	0.60	0,2	2,5	2,5
10^{-4}	0,04	0,04	0,08	0.08	0,08	0,08
B. Subtilis « Ungar »						
10^{-1}	2500	5000	5000	5000	5000	5000
10^{-2}	1250	2500	5000	5000	5000	5000
10^{-3}	0,62	0.62	2,50	5.0	40	40
10^{-4}	0,31	0,31	0.62	0,62	0,62	0,62
Staph. Aureus « H. Londres »						
10^{-1}	0,02	0,02	0,02	0,04	0,04	0,04
10^{-2}	0,02	0,02	0,04	0,04	0,04	0,04
10^{-3}	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
10^{-4}	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Staph. Aureus « C. 1060 »						
10^{-1}	625	1250	2500	2500	2500	5000
10^{-2}	160	312	625	625	1250	1259
10^{-3}	10	10	10	40	80	160
10^{-4}	10	10	10	20	40	40
Strept. Proteiformis « M. 317 »						
10^{-1}	2.5	5	10	10	10	10
10^{-2}	2,5	5	5	5	5	5
10^{-3}	2,5	5	5	5	5	5
10^{-4}	2,5	5	5	5	5	5

Spécilline « G », Lot 1.301. Exp. : déc. 1950, 1.600 U/mg.

Milieu de SUREAU :

Eau peptonée pH 8,4..... 8,5
Glucose 30 %..... 1,5
P.S.P. à 1,5 %..... 0,5

Ensemencement : Dilution 10^{-3} culture 18 h. sur bouillon.

Il apparaît aisément sur ces tableaux que :

1° Le *Staphylococcus Aureus* est inhibé par une concentration comprise entre 0,02 et 0,04 U.O./c.c., les résultats étant pratiquement identiques, quel que soit le nombre de germes ensemencés et quel que soit le temps d'incubation précédant la lecture;

2° Les *B. Subtilis* « *Byline* » *et* « *Ungar* », producteurs de Pénicillinase, ont une sensibilité à la pénicilline variable suivant : l'importance de l'ensemencement, la durée de l'incubation;

3° Le *Staphylococcus Aureus* « *C 1060* », naturellement pénicillino-résistant varie légèrement dans sa sensibilité suivant les deux facteurs précédents. Il présente donc, à ce double point de vue, une certaine analogie avec les souches de *B. Subtilis* étudiées.

4° Le *Streptococcus Proteiformis* « *M 307* » ne paraît, par contre, nullement influencé par la dose ensemencée et la durée du séjour à l'étuve, et bien que peu sensible, se rapproche beaucoup dans son comportement du germe pénicillino-sensible témoin.

Nous nous serions bien gardé de généraliser sur ces seules données, mais confrontant aujourd'hui ces résultats avec ceux avancés par d'autres auteurs, nous croyons légitime de formuler la remarque suivante :

La notion de Pénicillinase expliquant, en partie, certains faits de pénicillino-résistance bactérienne entraîne deux conséquences pratiques importantes pour la pratique du test de Pénicillino-sensibilité d'un germe :

1° *L'action de la pénicilline sur une souche productrice de Pénicillinase paraît dépendre, pour une grande part, du nombre de germes en présence, c'est-à-dire de l'importance de l'ensemencement.*

2° *En conséquence, étant donné la nécessité impérieuse de pratiquer cette détermination de pénicillino-sensibilité — notamment pour les souches soupçonnées d'être pénicillino-résistantes, à plus forte raison d'être productrices de Pénicillinase —, il importe de procéder, dans des conditions rigoureuses toujours iden-*

tiques, non seulement du point de vue du volume et de la composition du milieu, mais surtout de l'importance de l'ensemencement et du moment de la lecture.

On conçoit, de plus, la répercussion de cette notion sur la conduite de la pénicillinothérapie. Alors que la dose utile en clinique n'est, en général, conditionnée que par la pénicillino-sensibilité du germe, elle sera, de plus, s'il s'agit d'un germe résistant producteur de Pénicillinase, fonction de l'importance de la pullulation microbienne dans l'organisme.

Ceci constitue un argument de plus en faveur de la technique de l'hémoculture en tubes, proposée par Reilly, qui donne une idée du nombre de germes en cause.

SENSIBILITE DES GERMES DEVENUS PENICILLINO-RESISTANTS AUX AUTRES AGENTS ANTIMICROBIENS

Devant les progrès de la chimie de la pénicilline et la notion de la pluralité structurale des pénicillines il est intéressant de se demander si une pénicillino-résistance vis-à-vis de l'une des pénicillines (G par exemple) s'accompagne obligatoirement d'une résistance vis-à-vis des autres pénicillines élémentaires.

Dowling et ses collaborateurs (34), dans une étude comparative de la pénicilino-résistance, acquise vis-à-vis des pénicillines G et K, montrent que quand la résistance à l'une des fractions augmente *in vitro* ou *in vivo*, la résistance à l'autre fraction augmente aussi sensiblement dans la même proportion. Ceci est vrai pour la plupart des germes habituellement responsables des infections humaines.

Par contre, il est intéressant de rappeler que *la pénicillino-résistance est absolument indépendante de la sulfamido-résistance* et ceci justifie, dans bien des cas, l'association des deux thérapeutiques. De plus, Klimek, Cavallito et Bailey (73) ont montré que la résistance acquise aux antibiotiques est une loi générale, mais que le degré en est très variable; la résistance acquise *in vitro* par repiquage en

série, en présence de concentration croissante d'antibiotique, est nulle pour *l'acide aspergillique*, légère pour la *gliotoxine*, notable pour la *pénicilline* et la *pyocyanine*, importante et très rapide pour la *streptomycine*.

Quoi qu'il en soit, la *résistance à un antibiotique n'est nullement affectée par la résistance à un autre.*

Nous avons eu personnellement l'occasion de le vérifier à deux reprises sur des staphylocoques pénicillino-résistants.

Le premier malade présentait une pleurésie purulente, dont l'évolution n'était nullement influencée par la pénicillinothérapie locale et générale. Le germe en cause, un staphylocoque doré, s'est montré *in vitro* 500 fois plus résistant à la pénicilline que le *Staphylococcus Aureus H.* Testé en face de la *tyrothricine*, — nous ne possédions pas encore la streptomycine — il n'était que 4 fois moins sensible. L'administration locale de cet antibiotique a permis d'obtenir la stérilisation de l'épanchement.

Le deuxième sujet hospitalisé dans le service de notre maître le Professeur Tapie, présentait des suppurations cutanées et ganglionnaires staphylococciques au cours d'une leucémie myéloïde. La souche isolée, chez ce malade, pousse en présence d'une concentration de pénicilline égale à 156 U.O./c.c. L'administration de pénicilline à dose massive n'entraîne aucune modification du syndrome infectieux général et des manifestations suppurées locales, alors que des doses modérées de *streptomycine* amenèrent, en quelques jours, une transformation radicale.

Le premier pas réalisé dans l'immense domaine des antibiotiques par la découverte et l'utilisation de la pénicilline a été un incomparable succès.

« *Par la réunion de propriétés extrêmement favorables : pouvoir bactéricide extrêmement élevé, absence complète de toxicité, indépendance du pouvoir bactéricide par rapport aux produits de décomposition tissulaire et au nombre des bactéries et le fait qu'elle ne provoque pas rapidement la résistance des bactéries, la pénicilline reste unique parmi les substances antibactériennes et, en fait, se rapproche de l'agent chimiothérapique idéal, le « boulet magique », dont Paul ERLICH avait rêvé.* » (Chain.)

Nous connaissons encore mal le mode d'action de la pénicilline sur les germes et, par conséquent, le déterminisme de la sensibilité ou de la résistance d'un germe à cet antibiotique. Il est vraisemblable que la Pénicillinase intervient directement ou indirectement dans l'un de ces processus. Il est possible qu'une connaissance plus précise de cet enzyme aide à pénétrer le mécanisme intime de l'action antibactérienne de la pénicilline.

Et pourtant déjà nous voyons se préciser la menace de la pénicillino-résistance de souches appartenant à des espèces habituellement sensibles. Qu'il s'agisse d'une pénicillino-résistance acquise par adaptation ou d'une sélection de souches, naturellement résistantes, on peut envisager le jour où des espèces microbiennes autrefois sensibles deviendront entièrement résistantes.

En face de ce monde des microorganismes qui vivent, qui s'adaptent et qui se défendent, bactériologistes et biochimistes s'acharneront à conserver leur avance et s'efforceront de mettre à la disposition du clinicien des agents thérapeutiques toujours plus efficaces.

CONCLUSIONS

1° L'examen bactériologique de sang ou d'exsudats provenant de malades soumis à la pénicillinothérapie présente de nombreuses difficultés. Certaines paraissent en rapport avec la persistance de faibles quantités de l'antibiotique dans le prélèvement.

2° Le seul fait de porter l'échantillon à l'étuve à 37° après l'avoir ensemencé sur un milieu nutritif ne suffit pas à empêcher l'activité antibiotique qui persiste, diminuée mais notable, pendant plus de 24 h. à 37°. Il faut donc faire intervenir un facteur *Antipénicilline.*

3° Les antisulfamides classiques : peptones, extraits tissulaires, sang, pus, acide para-amino-benzoïque, sont, en règle générale, sans action.

Par contre, la cystéine a un pouvoir antipénicilline incontestable très intéressante pour l'étude du mécanisme chimique de l'action des antibiotiques et pour la pratique du test de stérilité de la pénicilline. Malheureusement, cette activité ne s'exerce pas en présence de sang, de bouillon et de pus. Ce composé ne semble donc pas pouvoir être utilisé pour la mise en culture des produits biologiques provenant de sujets soumis à la pénicillinothérapie.

4° Le seul facteur paraissant actuellement utilisable est la *Pénicillinase*, enzyme découvert par Abraham et Chain à partir de broyat microbien de colibacilles; les auteurs ont proposé différentes méthodes pour l'obtenir et le purifier à partir de germes des groupes Colibacille et Subtilis.

Nous avons étudié la *Pénicillinase-Subtilis* et cherché à préciser :

— Les conditions de production (souche, milieu, durée d'incubation, addition de pénicilline);

— L'activité antipénicilline;

— La stabilité des préparations.

Nous soulignons l'absence de proportionnalité entre la quantité de pénicilline détruite en un temps donné et celle de la Pénicillinase nécessaire pour cette inactivation. Il faut donc tester chaque lot de façon rigoureuse en précisant la concentration de pénicilline utilisée et le temps d'incubation avant la lecture.

5° Appliquant cette méthode à la bactériologie clinique, nous rapportons en détail les résultats d'examens bactériologiques pratiqués chez dix-huit sujets soumis à la pénicillinothérapie et atteints d'infections à germes provenant d'espèces habituellement pénicillino-sensibles.

Cette statistique est très démonstrative, comme d'ailleurs sa comparaison à celle de Dowling et Hirsh et cependant le problème ne paraît pas pleinement résolu.

6° La notion de Pénicillinase bactérienne explique aussi certaines difficultés rencontrées dans la pratique des dosages de Pénicilline dans les liquides organiques ou la récupération de l'antibiotique dans les urines.

Elle intervient parfois dans la conduite pratique de la pénicillinothérapie.

7° Désireux de préciser les rapports de la Pénicillinase et de la pénicilino-résistance, nous notons que :

La production de Pénicillinase paraît absolument indépendante de la susceptibilité à la pénicilline d'une espèce bactérienne. (Toutes les espèces pénicillino-résistantes ne produisent pas de Pénicillinase et toutes les espèces qui élaborent l'enzyme ne sont pas insensibles à la pénicilline.)

Par contre, si l'on considère les souches résistantes au sein d'espèces sensibles, on est amené à distinguer :

— Une pénicillino-résistance acquise *in vitro* sans rapport avec la production de Pénicillinase.

— Une pénicillino-résistance naturelle ou encore acquise *in vitro* qui coïncide, en général, avec l'aptitude à à élaborer l'enzyme.

Dans ces cas, la notion de Pénicillinase paraît donc liée au mécanisme de la pénicillino-résistance naturelle ou acquise *in vivo*. Ce processus est encore bien mal connu, même pour les staphylocoques qui constituent pourtant

l'espèce pénicillino-sensible qui paraît acquérir le plus facilement la pénicillino-résistance.

8° La possibilité, pour un germe, de présenter une résistance acquise à l'égard de l'antibiotique nous conduit à insister à nouveau sur la nécessité d'un contrôle bactériologique de la pénicillinothérapie et en particulier sur la détermination de la pénicillino-sensibilité de la souche bactérienne en cause.

La mesure de la sensibilité bactérienne à la pénicilline est d'ailleurs rendue délicate par l'existence de germes produisant une Pénicillinase. En effet, l'action de la pénicilline paraît dépendre alors du nombre de germes en présence et du temps d'incubation contrairement à ce qui se produit classiquement pour les germes pénicillino-sensibles sur lesquels seule intervient la concentration antibiotique.

9° Le test est d'autant plus important à pratiquer que la résistance d'une souche microbienne à la pénicilline est absolument indépendante de sa susceptibilité à l'égard des autres agents antiinfectieux. On peut donc ainsi adopter la posologie, au besoin changer la médication antibiotique, pour permettre au malade de lutter dans les meilleures conditions contre le processus infectieux.

Le Président de la thèse :

TAPIE.

Vu : Le Doyen,

J. CALVET.

Vu et permis d'imprimer :

Toulouse, le 31 mai 1948.

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

Nous nous contenterons de citer ici :

1° Les revues générales les plus importantes sur la pénicilline renvoyant à ces ouvrages pour une bibliographie plus complète ;

2° Les publications originales que nous avons pu nous procurer concernant la question des antipénicillines et de leurs applications.

I. -- REVUES GÉNÉRALES

1. **A. ABAZA.** — **Acquisitions médicales récentes dans les pays alliés.** (Doin, Paris, 1945.)
2. **F. BUSTINZA-LACHIONDO.** — **Les antibiotiques antimicrobiens et la pénicilline.** (O. Zebuck, Paris, 1946.)
3. **A. FLEMING.** — **Penicillin : Its practical application. Bacteriological control of Penicillintherapy.** (Butterworth, London, 1946.)
4. **C. LEVADITI.** — **La Pénicilline et ses applications pratiques.** (Masson, Paris, 1945.)
5. **R. MARTIN, F. NITTI, B. SUREAU et J. BERROD.** — **La Pénicilline et ses applications cliniques.** (Flammarion, Paris, 1945.)
6. **J.-P. MARTY.** — **La Pénicilline. Ses possibilités d'application en Thérapeutique Vétérinaire.** (Vigot, Paris, 1948.)

II. -- PUBLICATIONS ORIGINALES

1. **E. P. ABRAHAM et F. CHAIN.** — **An enzyme from bacteria able to destroy Penicillin.** (Nature, 1940, **146**, 837.)
2. **D. G. ANDERSON.** — **The treatment of infections with Penicillin.** (New England Journal of Medicine, 1945, **232**, 400-405 et 423-429.)
3. **ANONYME.** — **Acquired resistance to Penicillin.** (British Medical Journal, 1947, 19. 7, 101.)
4. **J. H. BAILEY et C. J. CAVALLITO.** — **Reversal of Antibacterial action.** (Journal of Bacteriology, 1946, **51**, 592.)

5. **M. BARBER.** — **Coagulase-Positive Staphylococci resistant to Penicillin.** (Journal of Path. and Bact., 1947, **59,** 373-384.)

6. **M. BARBER.** — **Staphylococcal Infection due to coagulase penicillin resistant strains.** (British Med. Journal, 1947, 29. 11. 863-865.)

7. **J. M. BARNES.** — **Penicillin and B. Anthracis.** (Journal of Path. and Bact., 1947, **59,** 114-126.)

8. **H BECUWE.** — **La Pénicilline récupérée.** (Thèse Paris, 1945, n° 524.)

9. **W. D. BELLAMY, J. W. KLIMEK.** — **The relation between induced resistance to Penicillin and oxygen utilization.** (Journal of Bact., 1948, **55,** 147-151.)

10. **W. D. BELLAMY, J. W. KLIMEK.** — **Some properties of Penicillin resistant Staphylococci.** (Journal of Bact., 1948, **55,** 153-159.)

11. **R. BENDA.** — **L'acide para-amino-benzoïque.** (Semaine des Hôpitaux, 1946, **22,** 1577-1586.)

12. **R. G. BENEDICT. W. H. SCHMIDT et R. D. COGHILL.** — **Penicillin VII. Penicillinase.** (Archives of Biochemistry, 1945, **8,** 339-481.)

13. **J. W. BIGGER.** — **Synergic action of Penicillin and Sulfonamides.** (Lancet, 1944, 29. 7. 142.)

14. **R. BOIVIN, R. TULASNE, R. VENDRELY et R. MINCK.** — **Modifications cytologiques des bactéries sous l'effet de la Pénicilline.** (Bull. Acad. Méd., 1948, **132,** 37-40.)

15. **A. BONDI et C. C. DIETZ.** — **Production of Penicillinase by bacteria.** (Proc. Soc. Experimental Biol. and Med., 1944, **56,** 132-134.)

16. **A. BONDI et C. C. DIETZ.** — **Relationship of Penicillinase to the action of Penicillin.** (Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1944, **56,** 135-137.)

17. **A. BONDI et C. C. DIETZ.** — **Destruction of Penicillin by bacteria.** (Journal of Bact., 1944, **47,** 426.)

18. **A. BONDI et C. C. DIETZ.** — **The susceptibility of Penicillinase producing bacteria to Penicillin.** (Journal of Bact., 1946, **51,** 581-582.)

19. **P. BONET-MAURY.** — **L'enregistrement photométrique du mode d'action des antibiotiques.** (Bull. Acad. Méd., 1947, **131,** 221-224.)

20. **P. BROCH, J. KERHARO, J. NETIK et J. DESBORDES.** — **Une expérience française de récupération de la Pénicilline.** (Vigot, Paris, 1945.)

21. **P. BROCH, J. KERHARO et J. NETIK.** — **La Pénicilline. Dosages.** (Vigot, Paris, 1945.)

22. **P. BROCH, J. KERHARO, J. NETIK et J. JOFFRE.** — Fabrication de la Pénicilline. (Vigot, Paris, 1946.)

23. **C. J. CAVALLITO et J. H. BAILEY.** — Preliminary note on the inactivation of antibiotics. (Science. 1944, **100**, 390.)

24. **C. J. CAVALLITO, J. H. BAILEY, T. H. HASKELL, J. K. MAC CORMICK et W. F. WARNER.** — The inactivation of antibacterial agents and their mechanism of action. (J. Bact., 1945, **50**, 61-69.)

25. **Y. CHABBERT.** — Intérêt clinique de dosage de la Pénicilline dans les liquides organiques. Technique de **B. SUREAU.** Ses résultats. (Ann. Biol. clinique, 1947, **5**, 411-416.)

26. **Y. CHABBERT et B. SUREAU.** — Microdosage clinique des antibiotiques. Adaptation à une méthode dérivée de la « Slide Cell » de la technique glucose **P.-S.-P.** (Soc. Fse. Microbiol. 3. 7. 47 Ann. I. P. 1947, **73**, 1130-1132.)

27. **F. CHAIN.** — Quelques propriétés chimiques et biologiques des antibiotiques. (Le Méd. Français, 1947, **7**, 259-265.)

28. **V. L. CHANDLER, C. W. PRICE et W. A. RANDALL.** — Control and evaluation of blood assays for Penicillin. (Science, 1945, **102**, 355.)

29. **B. F. CHOW et C. M. MAC KEE.** — Inactivation of the antibiotic activity of Penicillin by Cystein Hydrochloride. I. Chemical Aspects of Inactivation. (Proc. Soc. Exp. Biol. et Med., 1945, **58**, 175-177.)

30. **R. COURTADE.** — Essais d'élimination de la Pénicilline chez le cheval. (Revue Vét. Mil., 1947, **2**, 13-30.)

31. **R. COURTADE.** — Le contrôle biologique de la Pénicilline. (Revue Vét. Mil., 1947, **3**, 306-312.)

32. **M. H. DAWSON, G. L. HOBBY et M. C. LIEBMANN.** — Penicillin Sensitivity of strains of non hemolitic streptococci isolated from cases of subacute bacterial endocarditis. (Proc. Soc. Exp. Biol. et Med., 1944, **56**, 101.)

33. **H. F. DOWLING et H. L. HIRSH.** — The use of Penicillinase in cultures of body fluids from patients under treatment with Penicillin. (Am. J. of. Med. Sc., 1945, **210**, 756-762.)

34. **H. F. DOWLING, H. L. HIRSH et C. B. O'NEIL.** — Studies on bacteria developing resistance to Penicillin fractions **X** et **G** in vitro and in patients under treatment for bacterial endocarditis. (Journ. of Clinical Investig., 1946, **25**, 665-679.)

35. **E. S. DUTHIE.** — Production of Penicillinase by organisms of the subtilis group. (Brit. J. Exp. Path., 1944, **25**, 96-100.)

36. **W. F. ELIAS, H. MERRISON et T. SPEICHER.** — Inhibiting factors in the determination of Penicillin in human sera. (Science, 1945, **102**, 223.)

37. **E. ENJALBERT et J. MONNIER.** — **Séméiologie cytologique des états méningés aigus.** (Toulouse Méd., 1946, **47**, 590-594.)

38. **E. ENJALBERT et J. MONNIER.** — **L'étude cytobactériologique des pleurésies purulentes traitées par la Pénicilline.** (Toulouse Méd., 1947, **48**, 563-570.)

39. **K. R. ERIKSEN.** — **Studies on the action of Penicillin on some rodshaped penicillinase producing bacteria.** (Acta Path. et Microb. Scand., 1946, **23**, 490-497.)

40. **K. R. ERIKSEN.** — **Induced resistance to Penicillin in pneumococci and streptococci.** (Acta. Path. et Microb. Scand., 1946, **23**, 498-511.)

41. **M. FAGUET.** — **Action antipénicilline du nucléinate de soude et comparaison de sa vitesse d'action avec celle des antisulfamides et antipénicillines connus.** (Soc. Fse. Microbiol., 6. 11. 47 Ann. I. P., 1948, **74**, 75-79.)

42. **M. FAGUET et P. NICOLLE.** — **Inhibition de la lyse bactériophagique par la Pénicilline. Levée de cette inhibition par la Pénicillinase.** (Soc. Fse. Microbiol. 3. 7. 47 Ann. I. P., 1947, **73**, 1150-1154.)

43. **E. F. GALE.** — **Correlation between penicillin resistance and assimilation affinity in Staphylococcus Aureus.** (Nature, 1947, **160**, 407-408.)

44. **E. F. GALE et A. W. RODWELL.** — **Amino acid Metabolism of Penicillin resistant staphylococci.** (J. of Bact., 1948, **55**, 161-167.)

45. **E. GALLARDO.** — **Sensitivity of Bacteria from infected wounds to Penicillin : Method of assay.** (War. Med., 1944, **6**, 86-91.)

46. **A. D. GARDNER.** — **Morphological effects of Penicillin on bacteria.** (Nature, 1940, **146**, 837-838.)

47. **L. P. GARROD et B. SUREAU.** — **Rôle du laboratoire au cours d'un traitement par la Pénicilline.** (Semaine des Hôpitaux, 1946, **22**, 57-63.)

48. **L. GORINI et A. TORRIANI.** — **Sulla purificazione della Pecillinasi da Bacterium coli.** (Boll. Soc. Ital. di Biol. Sper., 1946, **22**, 12.)

49. **L. GORINI et A. TORRIANI.** — **Biochemestry of Escherichia Coli and the production of Penicillinase.** (Nature, 1947, **140**, 332-333.)

50. **J. GREGOIRE.** — **Préparation d'une pommade à la Pénicilline.** (Ann. Ph. Françaises, 1947, **5**, 170-172.)

51. **F. GROS et M. MACHEBŒUF.** — **Recherches biochimiques sur le mode d'action de la Pénicilline sur les bactéries.** (Bull. Acad. Méd., 1948, **132**, 80-82.)

52. **F. GRUMBACH et F BOYER.** — **Méthode de titrage de la Pénicillinase.** (Soc. Fse. Microbio. 6. 11. 47 Ann. I. P., 1948, **74,** 19-23.)

53. **F. GRUMBACH, B. SUREAU et F. BOYER.** — **La Pénicillinase. Conditions de production. Etude de l'Activity.** (Soc. Fse Microbio. 6. 11. 47 Ann. I. P., 1948, **74,** 12-18.)

54. **L. HAHN.** — **Stabilization of Penicilin Solutions with Sodium Citrate.** (Lancet, 1947, **1,** 408-410.)

55. **L. HAHN.** — **Stabilization of Penicillin Salt Solutions with sodium citrate.** (Nature, 1947, **160,** 639.)

56. **G. J. HARPER.** — **Inhibition of Penicillin in routine culture media.** (Lancet, 1943, **2,** 869-871.)

57. **R. J. HENRY.** — **The mode of action of Sulfonamides.** (Rewiew Series II, 1 Josiah Macy Foundation, 1944.)

58. **R. J. HENRY et R. D. HOUSEWRIGHT.** — **Studies on Penicillinase : II. Manometric method for assaying Penicillinase and Penicillin kinetics of the Penicillin-Penicillinase reaction and the effects of inhibitors of Penicillinase.** (Journ. of Biol. Chem., 1947, **167,** 559-571.)

59. **N. E. HERREL, D. R. NICHOLS et D. H. HEILMAN.** — **Penicillin : its usefulness, limitations, diffusion and detection with analyses of 150 cases in wich it was employed.** (J. A. M. A., 1944, **125,** 1003-1011.)

60. **R. J. HICKEY.** — **Sterility test for Penicillin employing Cystein for inactivation.** (Science, 1945, **101,** 232-234.)

61. **A. T. HIMES et H. J. WHITE.** — **Penicillin inactivators.** (Journ. Bact., 1944, **47,** 426.)

62. **H. L. HIRSH et C. B. O'NEIL.** — **The inability of cystein to inactivate Penicillin in the presence of broth and blood.** (The Journal of Lab. and Clin. Med., 1946, **1,** 90.)

63. **G. L. HOBBY et M. H. DAWSON.** — **Bacteriostatic action of Penicillin on Hemolytic Streptococci in vitro.** (Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1944, **56,** 178-181.)

64. **G. L. HOBBY et M. H. DAWSON.** — **Effect of rate of growth of bacteria upon action of Penicillin.** (Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1944, **56,** 181-184.)

65. **G. L. HOBBY, K. MEYER, E. CHAFFEE et DAWSON.** — **Relationship of Penicillin to Sulfonamide Action.** (Proc. Soc. Exp, Biol. and Med., 1944, **56,** 184-187.)

66. **G. L. HOBBY, K. MEYER, E. CHAFFEE et DAWSON.** — **Activity of Penicillin in vitro.** (Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1942, **50,** 277-280.)

67. **R. D. HOUSEWRIGHT** et **R. J. HENRY**. — **Studies on Penicillinase I. The production, partial purification and practical application of Penicillinase.** (The Journal of Biol. Chemistry, 1947, **167**, 553-557.)

68. **R. F. HUNWICKE.** — **Ambiguous inhibition of Staphylococci by Penicillin inactived by Penicillinase.** (Brit. Med. Journ., 1946, 7. XII, 855-856.)

69. **C. HURIEZ** et **M. DESURMONT.** — **Pénicilline et Gonococcies d'après 600 observations (recueillies à Lille), les débuts de la Pénicillino-résistance.** (Presse Méd., 1947, 11. 1, 13-14.)

70. **J. C. KAKAUSS** et **E. G. SCOTT.** — **Penicillin blood-level determination with a Streptococcus Dysgalactiae resistant to normal blood inhibitors.** (Science, 1946, **104**, 327.)

71. **W. M. M. KIRBY.** — **Extraction of a highly potent Penicillin Inactivator from Penicillin resistant staphylococci.** (Science, 1944, **99**, 452-453.)

72. **W. M. M. KIRBY.** — **Stability of Penicillin solutions at room and incubator temperatures.** (J. A. M. A,, 1944, **125**, 628-629),

73. **J. W. KLIMEK, C.-J. CAVALLITO** et **J. H. BAILEY.** — **Induced resistance of Staphylococcus Aureus to various antibiotics.** (Journ. of Bact., 1946, 51, 580.)

74. **J. W. KLIMEK, C. J. CAVALLITO** et **J. H. BAILEY.** — **Induced resistance of Staphylococcus Aureus to various antibiotics** (Journ. of Bact., 1948, **55**, 139-145.)

75. **C. A. LAWRENCE.** — **Sterility test for Penicillin.** (Science, 1943, **98**, 413-414.)

76. **C. A. LAWRENCE.** — **Action of clarase upon Penicillin.** (Science, 1944, **99**, 15-16.)

77. **C. A. LAWRENCE.** — **Effects of enzyme preparations upon Penicillin.** (Journ. of Bact., 1945, **49**, 47-54.)

78. **R. LECOQ, P. CHAUCHARD** et **H. MAZOUE.** — **Un test chronaximétrique rapide de la sensibilité des microbes et de quelques autres substances à la Pénicilline et aux sulfamides.** (Bull. Acad. Méd., 1946, **130**, 508.)

79. **J. A. LE PAGE, J. F. MORGAN** et **M. E. CAMBELL.** — **Production and Purification of Penicillinase.** (J. Biol. Chemistry, 1946, **166**, 465-472.)

80. **C. LEVADITI** et **J. HENRY.** — **Pénicilline et autolysine.** (C. R. Soc. Biol., 1946, **140**, 734-736.)

81. **C. LEVADITI** et **J. HENRY.** — **La pénicillo-résistance de la Klebsiella Pneumoniae (Bacille de Friedlander).** (C. R. Soc Biol., 1946, **140**, 739-740.)

82. **C. LEVADITI et J. HENRY.** — **Méthode pour la mise en évidence des modifications morphologiques et tinctoriales des micro-organismes soumis à l'influence des antibiotiques.** (Acad. Sciences, 1947, **225**, 1190.)

83. **A. J. LIEBMANN, E. B. MAC QUARRIE et D. PERLSTEIN.** — **A standard Penicillinase Preparation.** (Science, 1944, **100**, 527-528.)

84. **J. A. de LOUREIRO et E. LITO.** — **Stabilité de la Pénicilline dans les solutions aqueuses de quelques substances.** (Arch. Portug. des Sciences Biol., 1946, 5. 4, 55-56.)

85. **C. M. MAC KEE et C. L. HOUCK.** — **Induced resistance to Penicillin of culture of Staphylococci, Pneumococci and Streptococci.** (Proc. Soc. Exp. Biol. et Med., 1943, **53**, 33.)

86. **E. B. MAC QUARRIE et A. J. LIEBMANN.** — **Studies on Penicillinase.** (Arch. Biochemistry, 1944, **5**, 307.)

87. **R. MARTIN.** — **La Pénicilline. Etude théorique; comparaison entre le mode d'action des sulfamides et celui de la Pénicilline. (Acquisitions médicales récentes. Journées Médicales Broussais, 1946).** (Flammarion, Paris, 1947.)

88. **R. MARTIN, B. SUREAU, J. BERROD, A. FRIBOURG-BLANC, F. DEPIN et O. SCHURR.** — **La technique de l'hémoculture chez des malades atteints d'endocardites malignes lentes traités par la Pénicilline.** (Ann. Ph. Françaises, 1946, 6-9, 204-207.)

89. **P. MILLER et M. BOHNOFF.** — **The development of Penicillin resistance by meningococcus in vivo.** (Journ. of Bact., 1946, **51**, 580-581.)

90. **P. MOLLARET.** — **Sur un principe directeur, peut-être nouveau, dans l'administration des antibiotiques : l'intérêt de l'arrêt brutal.** (Bull. Soc. Méd. Hôp, Paris, 1947, **63**, 643-645.)

91. **J. MONNIER et E. ENJALBERT.** — **Quelques aspects bactériologiques de la Pénicillinothérapie. (Note préliminaire sur l'utilisation de la Pénicillinase).** (Toulouse Méd., 1947, **48**, 551-562.)

92. **J. F. MORGAN, M. E. CAMPBELL.** — **A rapid method for the production and isolation of Penicillinase.** (The Journal of Biol. Chemistry, 1947, **169**, 333-343.)

93. **M. MORGENSTERN.** — **La Pénicilline buccale.** (Presse Méd., 1947, **55**, 404-405.)

94. **F. MORRA.** — **Sull'Adattamento, in vitro, dello Stafilococco Aureo Oxford alla Penicillina.** (Boll. dell' Istituto Sieraterapico Mianese, 1947, **26**, 82-87.)

95. **R. D. MUIR et G. VALLEY.** — **A Suggested Sterility test for Penicillin.** (Science, 1945, **101**, 390-392.)

96. **K. M. PANDALAI et G. MARIAM.** — **Possible mode of action of Penicillin.** (Brit. Med. Journal, 1947, 9. 7, 210-211.)

97. J. PARAF. — La pratique actuelle du traitement de l'endocardite maligne. (Entretiens de Bichat, 1947, Exp. Scient. Fsc Paris.)

98. R. PERAULT. — La Pénicillinase. Méthode de préparation et de titrage. (C. R. Soc. Biol., 1945, **139**, 580.)

99. R. PERAULT. — La Pénicillinase-Coli. Variations de sa production en fonction de la souche microbienne, du milieu et du vieillissement des cultures. (C. R. Soc. Biol., 1945, **139**, 581-582.)

100. R. PERAULT. — La Pénicillinase-Coli Sa présence dans les corps microbiens, ses propriétés, son mode d'action. (C. R. Soc. Biol., 1945, **139**, 617-618.)

101. R. PERAULT. — L'antipénicilline du bacille Subtilis. (C. R. Soc. Biol., 1945, **139**, 618-619.)

102 R. PRATT. — Stabilization of Penicillin in aqueous solutions by low concentrations of Phosphate. (Nature, 1947, **159**, 223-235.)

103. R. PRATT et J. DUFRENOY. — Cytochemical interpretation of the mechanism of Penicillin action. (Bact. Rewiews, 1948, **12**, 79-103.)

104. A. R. PREVOT. — Méthode de titrage rapide de la Pénicilline par inhibition du pouvoir réducteur de W. Perfringens sur le vert Janus. (Ann. I. P., 1946, **72**, 471-472.)

105. H. PROOM. — Survival of Penicillin sensitive organism in dried Penicillin. (Lancet, 1946, **2**, 11-12.)

106. R. J. PULVERTAFT et J. YUDKIN. — Stabilization of Penicillin solution with phosphate. (Lancet, 1946, **2**, 265.)

107. C. H. RAMMELKAMP. — A method for determining the concentration of Penicillin in body fluids and exsudates. (Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1942, **51**, 95.)

108. C. H. RAMMELKAMP et T. MAXON. — Resistance of Staphylococcus Aureus to action of Penicillin. (Proc. Soc. Exp. Bioland Med., 1942, **51**, 386-389.)

109. G. RAMON et R. RICHOU. — Recherches sur les propriétés antibiotiques des solutions de Pénicilline formolées et sur leur stabilité. Conséquences pratiques. (Bull. Acad. Méd., 1946, **130**, 536.)

110. G. RAMON et R. RICHOU. — Sur une méthode d'évaluation des propriétés antidotiques des filtrats de culture de germes antagonistes. (C. R. Acad. Sciences, 1947, **224**, 1407.)

111. G. RAMON et R. RICHOU. — Sur la conservation de solutions de Pénicilline et de Streptomycine. Conséquences. (Presse Méd., 1947, **55**, 693.)

112. R. D. REID, D. C. FELTON, M. A. PITTROFF. — Prolongation of Penicillin activity with Penicillinase inhibiting confounds. (Proc. Soc. Exp. Biol. et Med., 1946, **63**, 438.)

113. **J. REILLY.** — Un procédé d'hémoculture en milieu anaérobie. (Ann. Biol. Clin., 1947, **5**, 398-400.)

114. **L. ROUQUES.** — Comment réussir une hémoculture au cours d'un traitement sulfamidé. (Presse Méd., 1945, **53**, 646.)

115. **F. R. SELBIE, R.-D. SIMON et J. MAC INTOSH.** — Bacteriological aspects of Penicillintherapy. (J. Path. and Bact., 1945, **57**, 47-58.)

116. **W. SMITH et M. M. SMITH.** — Production of sterile and stable penicillinase. (Lancet, 1945, **1**, 809-810.)

117. **W. W. SPINK, et V. FERRIS.** — Quantative action of Penicillin inhibitor from Penicillin Resistant strains of Staphylococci. (Science, 1945, **102**, 221-223.)

118. **W. W. SPINK, V. FERRIS et J. J. VIVINO.** — Comparative in vitro resistance of Staphylococci to Penicillin and to Sodium sulfathiazole. (Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1944, **55**, 207-210.)

119. **W. W. SPINK, V. FERRIS et J. J. VIVINO.** — Antibacterial effect of whole blood upon strains of staphylococci sensitive and resistant to Penicillin. (Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1944, **55**, 210-214.)

120. **A. R. STANLEY.** — Clarase Inactivation of Penicillin. (Science, 1944, **99**, 59.)

121. **B. SUREAU et F. BOYER.** — Inhibition des agents chimiothérapeutiques par des substances « anti ». Applications pratiques au Laboratoire Clinique. (Annales I. P., 1947, **73**, 1167-1172.)

122. **B. SUREAU et Y. CHABBERT.** — Méthode de titrage biologique des antibiotiques dans le sang, le liquide céphalo-rachidien et les milieux organiques. Application au dosage de la Pénicilline et de la Streptomycine. (Biol. Méd., 1948, **37**, 1-38.)

123. **B. SUREAU, F. DEPIN et O. SCHURR.** — Titrage biologique de la Pénicilline dans le sang et le liquide céphalo-rachidien en présence d'un indicateur de pH. (Ann. I. P., 1946, **72**, 665-667.)

124. **J. UNGAR.** — Penicillinase from B. Subtilis. (Nature, 1944, **154**, 236-237.)

125. **M. VALLEE.** — Etude du pouvoir bacteriolytique du Bacillus Subtilis : lysine et analysine. (C. R. Soc. Biol., 1945, **139**, 648-649.)

126. **S. A. WASKMAN.** — Nature and mode of action of antibiotic substances. (J. Bact., 1943, **45**, 64.)

127. **R. F. WATSON.** — Sensitivity of various Serological (Lancefield) groups of streptococci to Penicillin. (Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1944, **57**, 65.)

128. **M. WELSCH.** — Quelques propriétés de la Pénicillinase de Bacillus Bubtilis. (C. R. Soc. Biol., 1947, **141**, 852-855.)

129. **H. B. WOODRUFF et J. W. FOSTER.** — Bacterial Penicillinase (Journ. Bact. 1944, **47**, 425-426.)

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 11

PREMIÈRE PARTIE

I. LES ANTI-PENICILLINES 19

Antiseptiques 19
Chaleur 19
Stabilité de la Pénicilline 21
Extraits tissulaires 25
Stabilité de la Pénicilline 21
Acide para-amino-benzoïque 25
Clarase, takadiastase 27
Cystéine 27

II. LA PENICILLINASE 30

A. Les conditions de production 31
La Pénicillinase Coli 31
La Pénicillinase Subtilis 35

B. Etude de l'activité 39

C. Travaux personnels 43
Conditions de production 44
Etude de l'activité 45
Conservation des préparations 45

DEUXIÈME PARTIE

I. LES APPLICATIONS PRATIQUES 61

A. Laboratoire clinique 61

1. *Examens bactériologiques au cours de la Pénicillinothérapie* 61
Expérimentation sur l'animal 61
Résultats en clinique humaine 62
Résultats personnels 65

2. *Dosages de Pénicilline* 91

B. Laboratoire spécialisé 92
1. *Test de stérilité* 92
2. *Récupération de la Pénicilline* 96
C. Thérapeutique 97
1. *Contamination des préparations de Pénicilline* 97
2. *Infections polymicrobiennes* 99
3. *Pénicillinothérapie intestinale* 99

II. L'INTERET DOCTRINAL : PENICILLINASE ET PENICILLINO-RESISTANCE 101

A. Germes producteurs de Pénicillinase 102
1. *Technique de mise en évidence* 102
2. *Résultats* 102
B. Rôle de la Pénicillinase dans la Pénicillino-Résistance 105
1. *Sensibilité à la Pénicilline des espèces microbiennes* 107
2. *Résistance de souches appartenant à des espèces pénicillino-sensibles* 108
Staphylocoques 108
Streptocoques 113
Pneumocoques 115
Méningocoques 115
Gonocoques 116
C. Conclusions et Conséquences pratiques 117
1. *Origine des souches pénicillino-résistantes* .. 118
2. *Mécanisme de la Pénicillino-Résistance acquise* 119
3. *Détermination de la Pénicillino-Sensibilité d'un germe* 121
4. *Sensibilité des germes devenus pénicillino-résistants aux autres agents antimicrobiens* 127

CONCLUSIONS 130

BIBLIOGRAPHIE 133

Toulouse — Imprimerie du Centre, 28, allée Jean-Jaurès — Juin 1948.